

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der medizinischen Fakultät der Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

DISSERTATION

**Charakterisierung des dopaminergen Systems bei transgenen
Ratten mit einem Antisensekonstrukt gegen die m-RNA der
Tryptophanhydroxylase**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der
Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Tom Fischer

geb. 17.03.1976 in Pirna

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. R. Morgenstern, Berlin**
- 2. Prof. Dr. H. Fink, Berlin**
- 3. Prof. Dr. W. H. Oertel, Marburg**

Datum der Promotion: 01.08.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Das serotonerge und das dopaminerge Transmissionssystem.....	7
2.1	<i>Das serotonerge Transmissionssystem.....</i>	<i>7</i>
2.1.1	Bedeutung	7
2.1.2	Entwicklung und Organisation.....	7
2.1.3	Serotoninmetabolismus.....	9
2.1.4	Die Tryptophanhydroxylase.....	10
2.2	<i>Das dopaminerge Transmissionssystem.....</i>	<i>12</i>
2.2.1	Bedeutung	12
2.2.2	Entwicklung und Organisation.....	12
2.2.3	DA-Synthese und Speicherung	14
2.2.4	DA-Freisetzung.....	15
2.2.5	DA-Wiederaufnahme und Abbau	16
2.3	<i>Einflüsse des serotonergen auf das dopaminerge Transmissionssystem</i>	<i>18</i>
2.4	<i>Einflüsse des dopaminergen auf das serotonerge Transmissionssystem</i>	<i>20</i>
3	Aufgabenstellung der Arbeit	22
4	Materialien und Methoden	24
4.1	<i>Material und Chemikalien.....</i>	<i>24</i>
4.2	<i>Tiere und Haltungsbedingungen</i>	<i>28</i>
4.3	<i>Methoden</i>	<i>29</i>
4.3.1	Vermehrung der transgenen Ratten.....	29
4.3.2	Genotypisierung der Ratten	29
4.3.3	DA-Freisetzung <i>in vitro</i> an Synaptosomenpräparationen	34
4.3.4	Bestimmung der DA-Wiederaufnahme <i>in vivo</i>	42
5	Ergebnisse	57
5.1	<i>Genotypisierung der Ratten.....</i>	<i>57</i>
5.2	<i>Untersuchungen zur synaptosomalen DA-Freisetzung in vitro.....</i>	<i>57</i>
5.2.1	Vergleich der Absolutwerte	57
5.3	<i>Untersuchungen zur DA-Wiederaufnahme in vivo.....</i>	<i>59</i>
5.3.1	k-Werte	59
5.3.2	v_{\max} -Werte	62
5.3.3	Altersvergleich.....	63
5.3.4	Zusammenfassung.....	64
6	Diskussion.....	65
6.1	<i>Wirkung des Transgens</i>	<i>65</i>
6.2	<i>Methodik.....</i>	<i>67</i>
6.2.1	Untersuchungen zur DA-Freisetzung <i>in vitro</i>	67
6.2.2	Untersuchungen zur DA-Wiederaufnahme <i>in vivo</i>	67
6.3	<i>Ergebnisse</i>	<i>71</i>

Abkürzungsverzeichnis

3-MT	3-Methoxytyramin
5,7-DHT	5,7-Dihydroxytryptamin
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPA	Kontinuierliche Amperometrie (Continuous Potential Amperometry)
DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	Dihydroxyphenylacetat
DPV	Differentialpuls-Voltammetrie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCV	Schnelle Zyklische Voltammetrie (Fast Cyclic Voltammetry)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HPLC	Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (High Pressure Liquid Chromatography bzw. High Performance Liquid Chromatography)
HVA	Homovanillinsäure
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
MAO	Monoaminoxidase
MFB	Mediales Vorderhirnbündel (Medial Forebrain Bundle)
ODS	Octadecylsilan
PBS	Phosphat-Puffer-Kochsalzlösung (Phosphat Buffer Saline)
PCPA	Para-Chlorophenylalanin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
SN	Substantia nigra
TPH	Tryptophanhydroxylase
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Das Zentralnervensystem (ZNS) ist ein komplexes System, bestehend aus einer Vielzahl von Teilsystemen. Eine seiner elementarsten Eigenschaften ist die Kooperation und gegenseitige Einflußnahme seiner Komponenten. Viele Kerngebiete und Transmissionssysteme interagieren direkt oder indirekt miteinander. Umschriebene Fehlfunktionen können somit entweder weitreichende Folgen auf andere Systeme haben, oder aber durch kompensatorische Regulationsmechanismen interagierender Systeme ausgeglichen werden.

Einige Krankheiten des ZNS werden heute nach der Feststellung eines Funktionsdefizits eines speziellen Systems durch Ausgleich dieses Defizits behandelt (Morbus Parkinson – Ersatz von Dopamin (DA), Depression – Erhöhung der Noradrenalin- und Serotonin-Konzentration im synaptischen Spalt). Wenn auch dieses Prinzip in einer Vielzahl von Fällen zum Erfolg geführt hat, zeichnet sich doch ab, daß der Ausgleich des Defizits die Symptomatik der behandelten Krankheit nur zeitlich begrenzt oder ungenügend beeinflusst. Bei der Therapie des Morbus Parkinson mit L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) kann in frühen Phasen der Krankheit eine Verbesserung der Symptomatik durch Substitution des fehlenden Transmitters erreicht werden. Jedoch läßt sich der progrediente Verlauf der Krankheit nicht aufhalten. Nach einigen Jahren läßt die Wirkung der L-DOPA-Therapie nach und die Symptome des Morbus Parkinson treten wieder zutage. Diese sind nicht zuletzt auf die Über- oder Unterfunktion eng interagierender Transmissionssysteme zurückzuführen. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das cholinerge Transmissionssystem. Neuere Therapien zielen darauf ab, auch die interagierenden Systeme und deren Über- oder Unterfunktion zu beeinflussen. So scheint die Dauerstimulation des Nucleus subthalamicus ein vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung der Parkinsonschen Krankheit zu sein [Pinter, 1999 #102]. Zahlreiche Daten für enge funktionelle Beziehungen finden sich auch für das dopaminerge und serotonerge System, deren Interaktion Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

Während beim Morbus Parkinson allgemein akzeptiert ist, daß der zugrundeliegende DA-Mangel zu den motorischen Defiziten führt, ist das Szenario bei vielen psychiatrischen Krankheiten weitaus komplexer. Für die Ätiologie der Schizophrenie beispielsweise

wurden immer wieder neue Hypothesen hervorgebracht, die auf Abweichungen in verschiedensten Transmissionssystemen basieren. Ebenso kann das Krankheitsbild der Depression nicht allein auf Abweichungen der Funktion noradrenerger Mechanismen zurückgeführt werden. Schizophrenie und Depression sind häufige Krankheiten, die mit schwerem Leidensdruck einhergehen und durch Suizid eine beträchtliche Letalität aufweisen. Um mehr Klarheit über die Pathogenese dieser Störungen zu erhalten ist es wichtig die Interaktionen potentiell involvierter Systeme genau zu erforschen. Aus dem erhaltenen Wissen, zu dem auch die vorliegende Arbeit ein Stückweit beitragen soll, können dann Ansätze für Therapien gewonnen werden, die bessere Behandlungserfolge versprechen.

2 Das serotonerge und das dopaminerge Transmissionssystem

2.1 Das serotonerge Transmissionssystem

2.1.1 Bedeutung

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein Indolamin und weit verbreitet sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich. Peripher wirkt es an der Funktion der Blutplättchen, Mastzellen und enterochromaffinen Zellen mit und spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, der Kontrolle des Tonus der glatten Darmmuskulatur und bei Vasokonstriktion und Vasodilatation. Im ZNS stellt Serotonin einen wichtigen Neurotransmitter dar, der in eine Vielzahl von physiologischen Funktionen involviert ist. Hierzu zählen: die Kontrolle des Schlaf-Wach-Zyklus und der Nahrungsaufnahme, Thermoregulation, kardiovaskuläre Regulation, Brechreflex, Sexualverhalten, spinale Regulation motorischer Funktionen, Schmerzverarbeitung und besonders klinisch relevant: psychische Regulationsvorgänge [Marsden, 1991 #88].

2.1.2 Entwicklung und Organisation

Serotonin enthaltende Zellen werden bei Ratten ab dem 12. Trächtigkeitstag gefunden [Wallace, 1983 #66]. Bis zum 18. Trächtigkeitstag kommt es zu verschiedenen Migrationsvorgängen, die schließlich zur Bildung der adulten Raphekerne führen [Lidov, 1982 #67]. Die Dichte der serotonergen Innervation des sich entwickelnden Organismus übertrifft oft die des adulten Tieres. So finden sich während der Entwicklung serotonerge Synapsen in Hirngebieten, in denen beim erwachsenen Tier keine mehr nachgewiesen werden können [Leslie, 1992 #68]. Die Entwicklung des serotonergen Systems bei der Ratte ist im Allgemeinen bis zum 21. Trächtigkeitstag abgeschlossen [Lidov, 1982 #67] [Rajaofetra, 1989 #69].

Eine bemerkenswerte Eigenschaft dieses Systems ist, daß eine relativ kleine, lokalisierte Kerngruppe Afferenzen zu praktisch jedem Hirngebiet und auch zum Rückenmark entsendet (Abb. 1) [Dahlström, 1965 #70]. Dabei ist die serotonerge Innervation nicht wie

früher angenommen diffus und unspezifisch, sondern zeigt im Lichte neuerer Forschung eine hochselektive, komplizierte Innervation spezifischer Strukturen. Eine große Anzahl von Rezeptorsubpopulationen und verschiedenen Second-Messenger-Systemen ist dabei in die Neurotransmission involviert [Peroutka, 1979 #71] [Conn, 1987 #72]. Auf dem derzeitigen Stand der Forschung wird die große Gruppe der Serotoninrezeptoren in 7 Familien eingeteilt (5-HT1 bis 5-HT7-Rezeptoren), die teilweise wiederum in Untergruppen eingeteilt werden. Serotonin entfaltet an verschiedenen Rezeptorsubpopulationen unterschiedliche Wirkungen. Dies ist ein Grund für die Fülle verschiedener Funktionen, die Serotonin innerhalb des ZNS wahrnimmt.

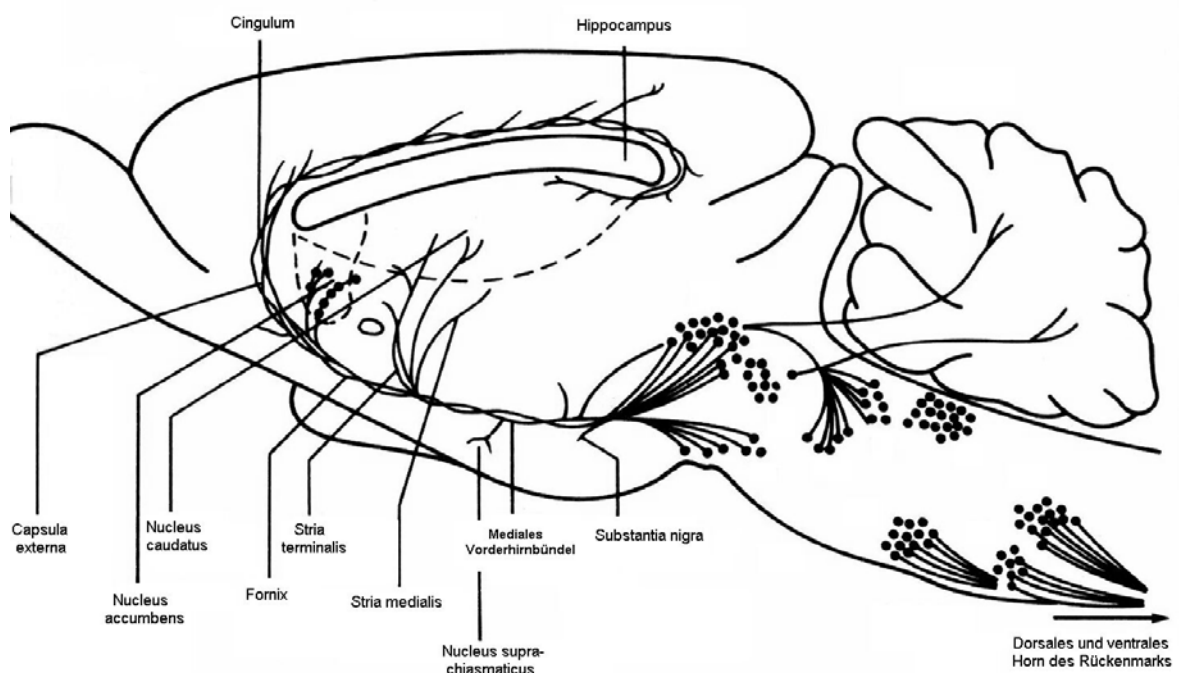


Abb. 1: Schematische Darstellung der wichtigsten serotonergen Projektionen im ZNS der Ratte [Marsden, 1993 #88]

Innerhalb des serotonergen Systems existieren mindestens zwei anatomisch und funktionell unterschiedliche Teilsysteme, die sich in morphologischen und pharmakologischen Gesichtspunkten unterscheiden. Ihnen werden unterschiedliche funktionelle Bedeutungen im Rahmen der Neurotransmission zugeschrieben [Mamounas, 1992 #75]. Zum einen gibt es eine Gruppe von Neuronen, die sich durch sehr feine Axone mit kleinen Varikositäten ($< 1\mu\text{m}$) auszeichnen [Mulligan, 1988 #73]. Diese entstammt vorwiegend den dorsalen Raphekernen. Zum anderen gibt es Neurone mit sogenannten „perlenförmigen“ (beaded) Axonen, deren Varikositäten im Gegensatz zur erstgenannten Gruppe größer als $2\mu\text{m}$ sind [Mamounas, 1991 #75]. Sie haben ihren Ursprung vorwiegend in den medianen Raphekernen. Die Projektion von den Raphekernen zum

Vorderhirn ist monosynaptisch. Die im Striatum endenden Axone verlaufen mit dem Medialen Vorderhirnbündel (Medial Forebrain Bundle, MFB). Pharmakologisch unterscheiden sich beide Teilsysteme hinsichtlich ihrer Beeinflussbarkeit. So reagieren die Zellen des Systems mit den feinen Axonen wesentlich empfindlicher auf Amphetamin als die des Teilsystems mit den perlenförmigen Varikositäten [Mamounas, 1992 #75].

2.1.3 Serotoninmetabolismus

Die Bildung von Serotonin erfolgt im neuronalen Zytoplasma aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erfolgt für die Aminosäure teils durch carriervermittelten Transport und teils durch Diffusion. Zwei Schritte sind zur Bildung von Serotonin notwendig: Der erste Schritt ist die von der Tryptophanhydroxylase (TPH) katalysierte Hydroxylierung von L-Tryptophan zu L-5-Hydroxytryptophan (5-HTP). Im zweiten Schritt wird 5-HTP durch die Dihydroxyphenylalanin(DOPA)-Decarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) umgewandelt [Boadle-Biber, 1993 #89].

Die Speicherung von Serotonin erfolgt hauptsächlich in Vesikeln, in die es durch einen aktiven Transportmechanismus aufgenommen wird. Ein kleiner Teil verbleibt jedoch auch im Zytoplasma. Die Freisetzung aus den Vesikeln erfolgt entweder exozytotisch über einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus oder aber über einen nicht-exozytotischen Mechanismus.

Die Inaktivierung nach der Freisetzung erfolgt hauptsächlich durch die Wiederaufnahme in die Nervenendigungen über eine $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase abhängigen Mechanismus [Shaskan, 1970 #93] [Ross, 1982 #92]. Danach kann der Transmitter entweder wieder in den Vesikeln gespeichert werden [Slotkin, 1978 #94], oder aber es kommt zum Abbau durch die Monoaminoxidase A (MAO-A) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA). Serotonin kann durch eine Reihe weiterer enzymatischer Umwandlungen auch zu Melatonin (N-Acetyl-O-Methylserotonin) weiter verstoffwechselt werden.

2.1.4 Die Tryptophanhydroxylase

Die TPH, auch als Tryptophan-5-monooxygenase bezeichnet, katalysiert mit der Hydroxylierung der Aminosäure Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serotoninbiosynthese [Grahame-Smith, 1964 #44] [Lovenberg, 1967 #18]. Im Gehirn von Wirbeltieren wird das Enzym selektiv in den serotonergen Neuronen der Raphekerne und der angrenzenden *Formatio reticularis* exprimiert. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der Produktion von Melatonin in der Epiphyse. Serotonin ist dabei eine Vorstufe von Melatonin.

In molekulargenetischen Untersuchungen wurde herausgefunden, daß die TPH eine enge Verwandtschaft zur Tyrosin-Hydroxylase und auch zur Phenylalanin-Hydroxylase aufweist [Grenett, 1987 #12]. Diese drei Hydroxylasen werden in der Familie der aromatischen L-Aminosäure-hydroxylasen zusammengefaßt. Es wird vermutet, daß alle drei Enzyme in ihrer Evolution aus dem gleichen Stammenzym hervorgegangen sind. Wie alle anderen Enzyme dieser Hydroxylasen-Familie ist auch die TPH tetrahydrobiopterinabhängig. Tetrahydrobiopterin agiert als Protonen-Donator, der essentiell für die Katalyse der Reaktion ist. Untersuchungen der Struktur der TPH ergaben, daß die TPH aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, einem katalytischen Kern und einer kleinen C-terminalen Region mit einer bis jetzt noch unklaren Funktion besteht [Yang, 1994 #37].

Nach Gabe eines Monoaminoxidasehemmers kommt es zu einem Anstieg von Serotonin in den Nerventerminalen, gleichzeitig nimmt aber die Aktivität der TPH ab [Macon, 1971 #19] [Hamon, 1972 #13]. Dieses Verhalten entspricht einer End-Produkt-Hemmung des Enzyms.

P-Chlorophenylalanin (PCPA) ist ein irreversibler Hemmstoff der TPH. Eine einzige Injektion mit PCPA (300mg/kg i.p.) führt zu einem fast vollständigem Verschwinden von Serotonin im Gehirn. Es dauert fast 2 Wochen bis wieder normale Spiegel erreicht werden [Park, 1994 #27]. Beim Vergleich von mit PCPA pränatal vorbehandelten Ratten mit einer Kontrollgruppe fiel auf, daß die behandelten Ratten im Durchschnitt ein um 20% geringeres Geburtsgewicht aufwiesen. In Verhaltenstests fielen sie durch einen Mangel an Aktivität und verstärktes Vermeidungsverhalten auf [Shemer, 1988 #32]. Der Entzug von

Serotonin während der Pränatalentwicklung führt also offensichtlich zu Veränderungen in der Entwicklung der Tiere. Die Entwicklung des serotonergen Systems im Rückenmark von mit PCPA behandelten Ratten verzögerte sich bis zum Tag 10 der postnatalen Entwicklung. Die behandelten Ratten zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren während des Zeitraums der verzögerten Entwicklung signifikante Defizite beim Erlernen und Ausführen von Schwimmbewegungen. Nach dem zehnten postnatalen Tag entwickelte sich das serotonerge System bei diesen Ratten normal [Nakajima, 1998 #24].

Beim Menschen ist das Gen der TPH seit einiger Zeit Gegenstand zahlreicher Studien zu Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei psychiatrischen Krankheiten gewesen [Gelernter, 1998 #115]. Danach scheinen Polymorphismen im Genabschnitt der TPH, der Promotorregion und auch in Introns des Genabschnitts mit verschiedenen psychopathologischen Phänomenen in Verbindung zu stehen.

Statistisch signifikante Übereinstimmungen zwischen Polymorphismen des Gens der TPH und folgenden psychopathologische Entitäten konnten nachgewiesen werden bei:

Suizidgefährdung bei Schizophrenen in einer koreanischen Population [Paik I, 2000 #51]

Suizidgefährdung bei depressiven Patienten [Tsai SJ, 1999 #53] [Mann, 1997 #116]

Interindividuelle Unterschiede hinsichtlich aggressiven Verhaltens [Manuck SB, 1999 #50]

Empfänglichkeit für die Entwicklung einer manisch-depressiven Erkrankung [Bellivier F, 1998 #39]

Suizidgefährdung bei gewalttätigen Strafgefangenen [Nielsen, 1994 #25]

Auch eine Assoziation eines TPH-Polymorphismus mit der 5-Hydroxyindolessigsäure Konzentration im Liquor wurde beschrieben [Nielsen, 1994 #25]. Dies spricht für eine Auswirkung auf den Serotoninmetabolismus. Diese Beispiele sollen die Bedeutung der TPH bei psychopathologischen Phänomenen deutlich machen.

2.2 Das dopaminerge Transmissionssystem

2.2.1 Bedeutung

Das dopaminerge System stellt eines der am meisten erforschten Neurotransmissionssysteme dar. Seit seiner Entdeckung 1959 mehren sich die Hinweise, daß es eine wichtige Rolle bei der Übersetzung von motivationell relevanten Stimuli in sinnvolle motorische Antworten spielt. Störungen werden daher mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Dazu zählen das Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom [Barkley, 1998 #7], Schizophrenie [Matthysse, 1973 #21] und der Morbus Parkinson. Des weiteren gibt es eine große Zahl von Hinweisen, die dem dopaminergen System eine wichtige Rolle hinsichtlich belohnender und verstärkender Effekte im Zusammenhang mit Suchterkrankungen zuschreiben.

Die Aktivität des Systems wird durch eine Vielzahl anderer Neurotransmitter und Pharmaka moduliert. Dazu zählen Noradrenalin [Ashby, 1995 #55], Cholezystokinin [Freeman, 1995 #57], Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) [Walters, 1995 #59], Kokain [Amalric, 1993 #84], Amphetamin und nicht zuletzt Serotonin [Kellan, 1995 #58]. Die dopaminerge Signalübertragung wird durch eine Balance von ausgeschütteter Transmittermenge, deren Verweilen am Rezeptor (maßgeblich bestimmt durch die Wiederaufnahme) und der Reaktionsstärke des Rezeptors beeinflusst.

2.2.2 Entwicklung und Organisation

Da in dieser Arbeit nur das mesotelencephale dopaminerge System (Abb. 2) untersucht wurde, wird in diesem Abschnitt auch nur auf dieses eingegangen werden. DA wird auch in zahlreichen anderen Bereichen des Körpers als Neurotransmitter verwendet. Als Beispiel sei hier nur das tuberohypophysäale System genannt, wo DA die Prolaktinausschüttung inhibiert.

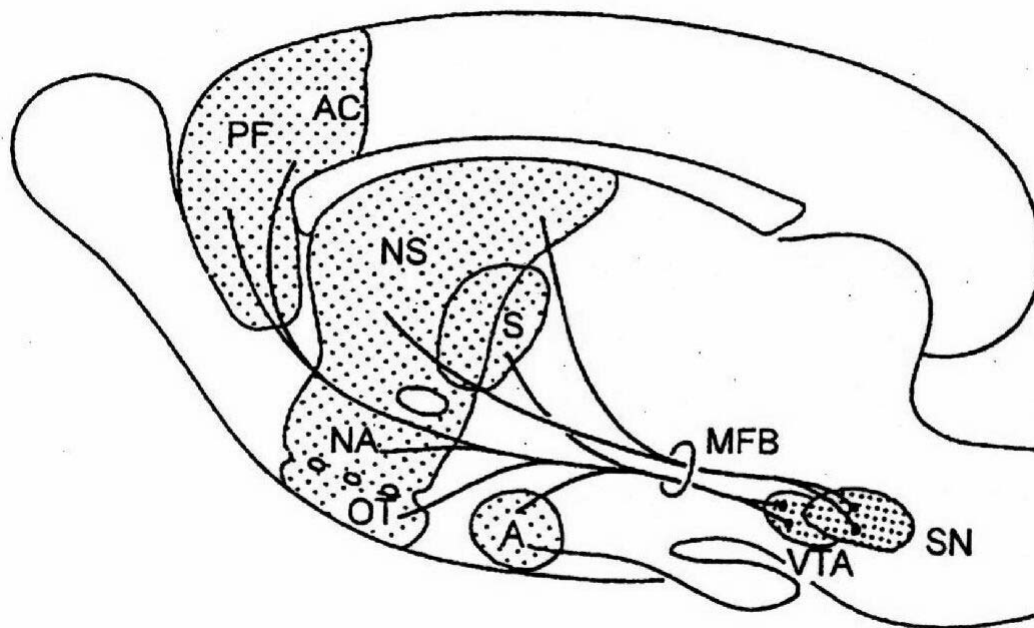


Abb. 2: Schematische Darstellung des dopaminergen mesotelencephalen Systems [Dunnett and Robbins, 1992 #95] (PF:präfrontaler Kortex; AC: vorderer cingulärer Kortex; NS: Striatum; S: Septum; NA: Nucleus accumbens; OT: Tuberculum olfactorium; A: amygdala; MFB: Mediales Vorderhirnbündel; VTA: ventrale tegmentale Area; SN: Substantia nigra)

Dopaminerge Neurone lassen sich bei der Ratte mittels Tyrosinhydroxylase-Immunhistochemie bereits am dreizehnten Trächtigkeitstag nachweisen [Specht, 1981 #75]. Nach der Migration aus dem Bereich der Keimzone ventrolateral des Aqueductus cerebri in der ventralen Flexur kommt es perinatal zu einer Ausdifferenzierung dieser Zellen in eine Substantia nigra (SN) pars compacta und pars reticulata. Etwa ab dem 20. Tag nach der Geburt ist diese Entwicklung weitgehend abgeschlossen [Nikkah, 1994 #76].

Anatomisch wird das mesotelencephale dopaminerge System in 3 Untereinheiten eingeteilt [Dunnett, 1992 #95]. Ein nigrostriatales System hat seinen Ursprung in dopaminergen Neuronen der SN pars compacta und pars lateralis sowie im Nucleus retrorubralis, entsprechend der Regionen A9 und A8 nach der Nomenklatur von *Dahlström* und *Fuxe* [Dahlström, 1962 #70] [Anden, 1965 #109]. Die Axone der Neurone projizieren mit dem MFB in den dorsalen Teil des Striatums.

Die Somata der Nervenzellen des mesokortikalen Systems liegen in der Area tegmentalis ventralis, Gebiet A10 nach *Dahlström* und *Fuxe*, und dem medialen Teil der SN. Die

Zielgebiete deren Projektionen liegen in der Amygdala, dem präfrontalen und cingulären Cortex sowie dem Septum.

Schließlich gibt es ein mesolimbisches System dessen Ausgangspunkt ebenfalls in der Area tegmentalis ventralis zu finden ist. Über das MFB innervieren die Axone der Neurone dieses Teils des mesotelencephalen dopaminergen Systems das Tuberculum olfactorium und den Nucleus accumbens, die zusammen das ventrale Striatum bilden [Nikkah, 1994 #76].

2.2.3 DA-Synthese und Speicherung

DA wird über eine Reihe von Vorstufen durch verschiedene Enzyme aus Tyrosin gebildet. Der durch die Tyrosinhydroxylase katalysierte Schritt der Hydroxylierung von Tyrosin in 3-Stellung unter Bildung von Dihydroxyphenylalanin (DOPA), stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der DA-Synthese dar. DOPA wird anschließend durch die unspezifische DOPA-Decarboxylase zu DA decarboxyliert.

Die Speicherung in der Präsynapse erfolgt innerhalb verschiedener Kompartimente (Abb. 3). *Kristensen* identifizierte 1993 drei funktionell verschiedene Verteilungsräume, die miteinander kommunizieren [Kristensen, 1993 #48] [Justice, 1988 #17] [Arbuthnot, 1991 #38]. Ein zytoplasmatisches Kompartiment speichert 76% des präsynaptischen DA. Dort laufen auch Synthese und Abbau des Transmitters ab. Mittels des DAT steht das Kompartiment mit dem Extrazellularraum in Verbindung.

Das zweite Kompartiment wird als vesikulärer Kurzzeitspeicher bezeichnet. Die Vesikel befinden sich in unmittelbarer Nähe der präsynaptischen Membran mit der sie durch filamentöse Strukturen verbunden sind. DA gelangt mit Hilfe eines vesikulären Monoamintransporters in die Vesikel. Die Freisetzung erfolgt auf exozytotischem Wege in den Extrazellularraum.

Ein vesikulärer Langzeitspeicher wird als drittes Kompartiment der DA-Speicherung angenommen. Die dazu gehörenden Vesikel befinden sich weiter von der präsynaptischen Membran entfernt. Sie stellen eine Art Reservepool für den vesikulären Kurzzeitspeicher

dar [Justice, 1988 #17].

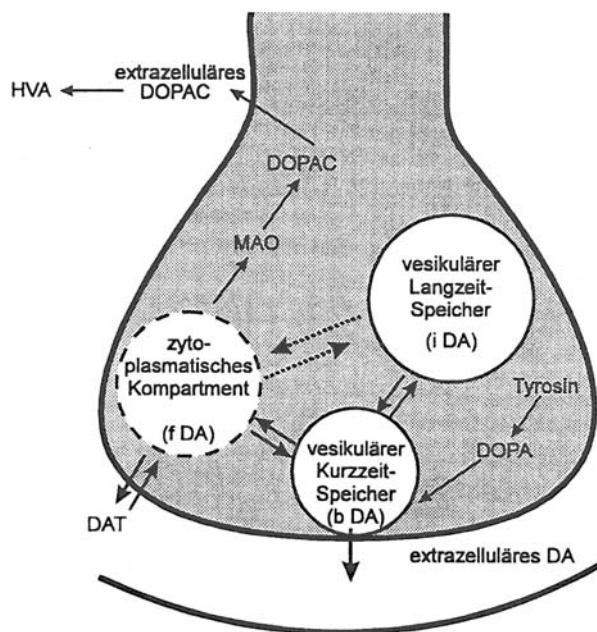


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transmitterpools in der dopaminergen Nervenendigung [Arbuthnott, 1991 #38] (HVA = Homovanillinsäure, DOPAC = Dihydroxyphenylalanin)

2.2.4 DA-Freisetzung

Es gibt zwei Wege der Freisetzung von DA. Eine Ca^{2+} -abhängige exozytotische und eine Ca^{2+} -unabhängige nichtexozytotische Freisetzung. Ausgelöst wird die exozytotische Freisetzung durch die Depolarisation der Zellmembran im Rahmen eines Aktionspotentials. Es kommt zur Öffnung in der Membran befindlicher spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und infolge dessen zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration führt über Phosphorylierungsprozesse zu einer Mobilisierung von transmitterhaltigen Vesikeln in Richtung der präsynaptischen Membran. Unter Vermittlung verschiedener Proteine kommt es zu einer Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran und zur Freisetzung von DA in den synaptischen Spalt. Durch K^{+} kann diese Kaskade ebenfalls in Gang gesetzt werden. Die dabei erreichte Freisetzung ist ein exozytotischer Prozeß. Die in dieser Arbeit untersuchte Freisetzung aus Synaptosomen basiert auf diesem K^{+} -induzierten Vorgang. Die nichtexozytotische Freisetzung erfolgt über den DA-Transporter und kann mit Amphetamin ausgelöst werden.

2.2.5 DA-Wiederaufnahme und Abbau

Unerlässlich für die zeitlich hochaufgelöste Funktion eines Neurotransmissionssystems ist die schnelle Entfernung des ausgeschütteten Transmitters aus dem synaptischen Spalt. Die größte Rolle im dopaminergen System spielt dabei die hochaffine Wiederaufnahme durch den DA-Transporter (DAT) [Horn, 1990 #15]. Dieses Transportermolekül ist in der präsynaptischen Membran lokalisiert. Mit Hilfe eines energieabhängigen aktiven Transportprozesses entfernt es DA aus dem synaptischen Spalt und transportiert es in den zytosolischen Speicherpool der Präsynapse. Dafür sind eine Reihe von Konformationsänderungen des Proteins notwendig. Die für den Transport notwendige Energie stammt aus einem Na^+ -Gradienten, der durch eine Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut wird. Es wird angenommen, daß die Bindung eines Na^+ - und eines Cl^- -Ions an der Außenseite des DAT nötig ist, um die Translokation eines DA-Moleküls zu bewerkstelligen. Die Ionen werden dabei ebenfalls ins Zellinnere transportiert [Hurd, 1989 #45].

Einen weiteren Weg der Entfernung des DA aus dem synaptischen Spalt stellen unspezifische Vorgänge wie Diffusion und unselektive Aufnahme in andere Kompartimente, z.B. Gliazellen, dar. Diese spielen aber eher einer untergeordneten Rolle und könnten das Fehlen des DAT nicht kompensieren wie in einer Studie mit Knockout-Mäusen gezeigt wurde [Jones 1998, #16]. Durch extrazellulären Metabolismus kommt es ebenfalls zu einer Verringerung der DA-Konzentration im synaptischen Spalt. Der DAT kann auch bei der Freisetzung von DA in den synaptischen Spalt eine Rolle spielen. Diese Art der Freisetzung ist im Gegensatz zum exozytotischen Modus kalziumunabhängig.

Verschiedene Prozesse wirken sich auf die Anzahl der in der präsynaptischen Membran lokalisierten DAT-Moleküle aus. So wurde in einer Studie gezeigt, daß Ratten, die sich Kokain in unbeschränktem Maße selbst zuführen konnten, nach 3 Wochen eine erhöhte Bindungsdichte von DAT-Liganden in Striatum und Nucleus accumbens aufwiesen. Wurden die Untersuchungen durchgeführt nachdem die süchtigen Tiere 3 Wochen lang einen Kokain-Entzug durchgemacht hatten, fand man erniedrigte Konzentrationen der DAT-Moleküle vor [Wilson, 1994 #36].

Bei der Erforschung von Therapiestrategien des Morbus Parkinson wird oft ein

tierexperimentelles Modell benutzt, bei dem mittels 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) das nigrostriatale System unilateral lädiert wird. An diesem Modell können pharmakologische, aber auch andere Therapieansätze wie Neurotransplantation oder Neurostimulation in ihrer potentiellen Wirksamkeit überprüft werden. In einer solchen Studie konnte gezeigt werden, daß es nach intraventrikulärer oder intrastriatärer Transplantation von fötalem mesencephalen Nervengewebe zu einer Verringerung der Clearance von DA aus dem Extrazellulärraum der intakten Seite kam. Dies wurde mit einer Verringerung der Anzahl der DAT-Moleküle begründet [Reum, 1995 #29] [Schäfer, 1995 #30]. Dieser Verringerung geht ein Anstieg der m-RNA für den DAT in der Substantia nigra parallel. In einer anderen Studie wurde gezeigt, daß Kokain zu einer Verminderung der m-RNA des DAT im Striatum führt. Eine Verringerung der DAT-Transportermoleküle wurde in dieser Studie jedoch nicht gefunden. Es wird vermutet, daß der Abbau der alten DAT-Moleküle noch nicht weit genug fortgeschritten war [Letchworth, 1999 #49].

Die Funktion des DAT kann neben der Auf- und Abregulation seiner Verteilungsdichte noch über weitere Mechanismen gesteuert werden. So liegen Daten vor, daß die Funktion des DAT durch Stimulation oder Inhibition des D2-Rezeptors reguliert werden kann [Meiergerd, 1993 #111]. Ebenfalls wird über die Regulation der DAT-Funktion über Phosphorylierung durch Proteinkinase C diskutiert [Zahniser, 1997 #112].

Der Abbau von DA erfolgt durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) [Kopin, 1985 #47]. Es gibt zwei Wege des Abbaus. Zum Einen kann DA durch die MAO in Dihydroxyphenylacetat (DOPAC) umgewandelt werden, dieses wird dann durch die COMT zu Homovanillinsäure (HVA) abgebaut. Zum Anderen kann DA auch direkt durch die COMT zu 3-Methoxytyramin (3-MT) metabolisiert werden. HVA und 3-MT stellen die wesentlichen Stoffwechselendprodukte von DA dar. Da COMT nicht in den präsynaptischen Terminalen der DA-Neurone vorkommt, müssen COMT-Metabolite vor ihrer Entstehung das dopaminerge Terminale verlassen haben. Dagegen können MAO-Metabolite auch entstehen, ohne das dopaminerge Terminale zu verlassen.

2.3 Einflüsse des serotonergen auf das dopaminerge Transmissionssystem

Im Folgenden sollen einige der wichtigsten bekannten Einflüsse des serotonergen auf das dopaminerge Transmissionssystem vorgestellt werden.

Das Bestehen einer größeren, aufsteigenden, serotonergen Projektion zu Bereichen des Gehirns, die einen Reichtum an dopaminergen Zellen aufweisen, ist schon seit den siebziger Jahren bekannt. So wurde bereits 1976 der Effekt einer elektrischen Stimulation der Raphekerne auf die Aktivität der SN untersucht. Es wurde gefunden, daß die SN einen inhibitorischen Einfluß aus den Raphekernen erhält, da die elektrische Stimulation der Raphekerne die SN-Neurone hemmte. Daneben wurden aber auch exzitatorische Effekte beschrieben [Dray, 1976 #11]. Die Organisation dieser Projektion wurde später mit radioautographischen Methoden, unter Zuhilfenahme von radioaktiv markiertem Serotonin, untersucht [Parent, 1981 #26].

Serotonerge Neurone mit Ursprung in den Raphekernen innervieren nicht nur die Ursprungsorte dopaminergener Projektionen, wie z.B. die SN. Auch in den Zielgebieten dopaminergener Axone, besonders im Striatum, findet sich eine hohe Dichte serotonerger Synapsen (Abb.1). Es werden also nicht nur Dendriten und Somata der dopaminergen Neurone innerviert, sondern auch Axone und deren Terminale [Blue, 1988 #40].

In einer großen Anzahl von Arbeiten wurden die Interaktionen der beiden Transmissionssysteme mit Hilfe von mehr oder weniger selektiven Serotoninantagonisten oder -agonisten untersucht. Die Einflüsse, die Serotonin bzw. Serotoninagonisten auf dopaminerge Neurone haben, sind vielfältig und komplex. Dabei ist unumstritten, daß eine Erhöhung des Serotoninspiegels in bestimmten Hirnarealen Änderungen im dopaminergen System auslöst. Perfusion des anterioren Striatums der Ratte mit verschiedenen Konzentrationen von 5-HT führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der extrazellulären DA-Spiegels [Benloucif, 1991 #2]. In einer anderen Studie führte die Verabreichung des selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmers Fluoxetin zu einer Erhöhung der im synaptischen Spalt verfügbaren Serotonin-Konzentration und diese wiederum zu einer Erhöhung der DA-Konzentration im präfrontalen Kortex [Matsumoto, 1999 #101]. Das gleiche Resultat wurde im Striatum von Ratten mit Alaproclate, einem weiteren Serotoninwiederaufnahmehemmer erzielt [Yadid, 1994 #117]. Die Spontanaktivität des

dopaminergen Systems scheint dagegen durch Serotonin eher gehemmt zu werden. So wurde durch die selektive Stimulation des 5-HT_{2B}-Rezeptors die Feuerungsrate von dopaminerge Zellen der VTA bei der Ratte deutlich gesenkt [Di Matteo, 2000 #97].

In weiteren Studien wurde das Verhalten des DA-Spiegels im Rattenstriatum, nach Stimulation von verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubpopulationen durch direkte Perfusion mit selektiven 5-HT-Rezeptoragonisten, beobachtet. Auch hier wurden dosisabhängige Steigerungen des DA-Spiegels beobachtet, die teilweise durch selektive 5-HT-Rezeptorantagonisten verhindert werden konnten [Benloucif, 1993 #3].

Eine besonders große Rolle bei dieser Steigerung der spontanen DA-Ausschüttung, scheint der 5-HT₃-Rezeptor zu spielen, denn die durch einen selektiven 5-HT₃-Rezeptoragonisten ausgelöste Steigerung der spontanen DA-Ausschüttung lag nur unwesentlich unter der, die direkt durch 5-HT ausgelöst wurde. Dies wird auch dadurch bestätigt, daß ein selektiver 5-HT₃-Rezeptorantagonist diese Effekte inhibierte [Blandina, 1989 #4]. Eine Erhöhung der DA-Freisetzung an superfundierten striatalen Dünnschnitten von Ratten ließ sich auch mittels eines 5-HT₄-Rezeptoragonisten nachweisen [Steward, 1996 #118].

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß der 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist Pindolol die durch 5-HT ausgelösten Steigerungen der DA-Ausschüttung vermindert [Parsons, 1993 #28]. Dies läßt vermuten, daß der 5-HT_{1A}-Rezeptor neben seiner Autorezeptorfunktion an den serotonergen Axonterminalen noch eine weitere Funktion auf postsynaptischer Seite wahrnimmt.

Bei Versuchen mit tonischer elektrischer Stimulation der Raphekerne wurde gezeigt, daß Serotonin den DA-Metabolismus steigern kann ohne die Ausschüttung zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Studie wurde eine Erhöhung des DA-Metaboliten DOPAC beobachtet [De Simoni, 1987 #10].

In einem anderen Versuchsansatz wurde auch eine durch 5-HT verursachte Hemmung der DA-Ausschüttung beschrieben. Die Ausschüttung war durch Applikation von K⁺-Ionen hervorgerufen worden, welche eine Freisetzung des Transmitters aus den synaptischen Vesikeln auslöst. Wurde der Hirnabschnitt mit 5-HT perfundiert, kam es zu einer Abschwächung dieser Ausschüttung. Da dieses Verhalten wiederum durch die Applikation

eines 5-HT₂-Antagonisten reversibel war, glaubt man, daß dieser, auf den Axonterminalen von dopaminergen Neuronen befindliche, Rezeptor für die Abschwächung der K⁺-induzierten Ausschüttung verantwortlich ist [Muramatsu, 1988 #23].

Die durch 5-HT bedingten Steigerungen der DA-Freisetzung werden wahrscheinlich über 5-HT_{2A}-Rezeptoren oder auch über 5-HT₃-Rezeptoren vermittelt. Es wurde aber auch gezeigt, daß 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten die Hemmung der DA-Freisetzung verhindern, die durch 5-HT verursacht wurde. [Blandina, 1989 #4] [Muramatsu, 1988 #23].

Die Applikation von PCPA führt zu einer irreversiblen Hemmung der TPH. Eine systemische Applikation von 400mg/kg Körpergewicht dieser Substanz führte nach 24 Stunden zu einer Abnahme der Aktivität dopaminerg Neurone im Mittelhirn. Dies wurde ebenfalls als stimulierender Einfluß des Serotoninsystems auf das DA-System interpretiert. [Minabe, 1996 #77].

2.4 Einflüsse des dopaminergen auf das serotonerge Transmissionssystem

Während, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, eine große Zahl von Arbeiten die Einflüsse des serotonergen auf das dopaminerge System beschreibt, gibt es vergleichsweise wenige Daten über Interaktionen in der entgegengesetzten Richtung. DA scheint einen hemmenden Einfluß auf die Ausschüttung von Serotonin auszuüben [Hery, 1980 #80]. So kam es nach einer durch 6-OHDA-verursachten neurotoxischen Läsion des nigrostriatalen dopaminergen Systems bei der Ratte zu einer 50%igen Verringerung von Serotonin im Striatum und zu einer 90%igen Steigerung des Serotoninumsatzes. Das wurde damit erklärt, daß durch den Wegfall des inhibitorischen dopaminergen Einflusses eine starke Erhöhung der Ausschüttung einsetzt, die dann zu einer Entleerung der Serotoninspeicherpools führt [Karstaedt, 1994 #81].

Eine intrastriatale neurotoxische Läsion mit 6-OHDA führt weiterhin zu einer Aussprossung von serotonergen Neuronen in den Bereich der Läsion. Gebiete mit einer vorher nur spärlichen serotonergen Innervation wiesen 2 Monate nach der Läsion eine erhöhte Dichte von serotonergen Nerven terminalen auf [Zhou, 1991 #86]. Weitere

Arbeiten stützen die Hypothese von einer serotonergen Hyperinnervation des nach einer Läsion von dopaminergen Neuronen der VTA an DA verarmten Striatums [Berger, 1985 #83] [Luthman, 1987 #82]. Die beschriebenen Versuche wurden an neonatalen Ratten vorgenommen. Wurde jedoch das dopaminerge nigrostriatale Faserbündel bei adulten Ratten lädiert, kam es zu einer Verringerung der striatalen serotonergen Innervationsdichte [Takeuchi, 1991 #85]. Dieser Unterschied wurde mit der höheren Plastizität des neonatalen ZNS begründet.

Die Läsion des nigrostriatalen dopaminergen Systems wirkt sich auch auf die Expression von Serotonin-Rezeptoren aus. So wurde eine erhöhte Expression von 5-HT₂-Rezeptor-mRNA beschrieben [Numann, 1995 #87]. Der Wegfall der dopaminergen Innervation führte zu einer Erhöhung der Rezeptordichte und damit wahrscheinlich zu einer verstärkten Transmission im serotonergen System. Dies ist ein weiteres Indiz für einen inhibitorischen Einfluß des serotonergen Systems auf das DA-System.

3 Aufgabenstellung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Kapiteln detailliert erläutert, sind zahlreiche Daten vorhanden, welche die Adaptation des DA-Systems auf reversible und irreversible Veränderungen am serotonergen System beschreiben. Viele dazu durchgeführte Studien werden nach folgendem Schema durchgeführt. Durch einen Eingriff, eine pharmakologische Manipulation oder andere Maßnahmen wird in einem Transmissionssystem eine Veränderung hervorgerufen deren Auswirkungen auf das andere Transmissionssystem dann untersucht werden. Dies geschieht *post partum*. Durch die oft beträchtliche Radikalität dieser Eingriffe kommt es zu starken Reaktionen, wie z.B. Vernarbungen bei Läsionen, die dann ihrerseits Folgen nach sich ziehen, die das Ergebnis der Untersuchung in unvorhersehbarer Weise beeinflussen. Zahlreiche Krankheiten des ZNS beim Menschen sind oft jedoch bereits kongenital vorhanden und entstehen nicht durch eine plötzliche Veränderung. Spezielle Genpolymorphismen können in Assoziationsstudien oft mit einem Risiko zur Entwicklung bestimmter Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Diese Abweichungen von der Norm sind ebenfalls kongenital.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Folgen einer kongenitalen Veränderung am serotonergen System auf das dopaminerge System. In einer anderen ebenfalls am Institut für Pharmakologie und Toxikologie erstellten Dissertation, wurde bereits untersucht, wie sich ein postpartal durch ein Neurotoxin (5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT)) hervorgerufener Defekt des serotonergen Systems auf das dopaminerge System auswirkt. Dazu wurde das Toxin stereotaktisch in die Raphe-Kerne injiziert, was zu einer Degeneration der dort entspringenden serotonergen Projektionen führte [Kay, 2001]. Die Parameter zur Untersuchung der DA-Wiederaufnahme waren in beiden Arbeiten die gleichen um so eine Vergleichbarkeit der Daten beider Arbeiten zu gewährleisten und eine Antwort auf die Frage zu erhalten, ob die kongenitale Beeinflussung des serotonergen Systems zu den gleichen Veränderungen am DA-System führt wie die postpartale.

Die TPH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serotonin-Biosynthese. Veränderungen dieses Enzyms wirken sich auf das serotonerge System aus [Nielsen, 1994 #25]. Bei den in dieser Studie untersuchten Tieren handelte es sich um transgene Ratten, die eine Antisense-m-RNA gegen die m-RNA der TPH exprimierten. Es wurde gezeigt, daß sich durch die Einfügung von spezifischen Sequenzen, die für

Antisense-m-RNA kodieren, die Expression bestimmter Proteine lebenslang unterdrücken bzw. verringern läßt [Schinke, 1998 #52]. Es kann davon ausgegangen werden, daß es durch die Antisense-m-RNA zur Funktionseinschränkung der TPH gekommen ist.

Um das dopaminerge System der Ratten, die die Antisense-m-RNA exprimierten zu charakterisieren, wurde die Freisetzung und die hochaffine Wiederaufnahme von DA untersucht. Die Freisetzung ist ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der Funktion eines Transmissionssystems. Sie wird über eine Vielzahl verschiedener Einflüsse moduliert (z.B. Menge des im synaptischen Endknopfes verfügbaren Transmitters, Besetzung präsynaptischer Rezeptoren, Funktion verschiedener Transportermoleküle u.v.a.m.). Die vom Dopamin-Transporter (DAT) abhängige hochaffine DA-Wiederaufnahme, auf die weiter unten im Speziellen eingegangen wird, reagiert ebenfalls empfindlich auf verschiedenste auf das dopaminerge System einwirkende Veränderungen und ist ein wichtiger Faktor bei der Transmissionssteuerung des dopaminergen Systems [Reum, 1995 #30] [Wilson, 1994 #36] [Erikson, 2000 #98].

Um eine Aussage zur DA-Freisetzung zu machen, wurde die Methode der Synaptosomen-superfusion gewählt. Diese *in vitro* Technik erlaubt eine Bestimmung der nach einem K+-Stimulus aus einer Synaptosomenpräparation freigesetzten DA Menge ohne Interferenz durch Wiederaufnahmeporgänge. Hierbei wurden transgene Tiere mit einer Kontrollgruppe verglichen. Das Alter der untersuchten Tiere betrug 9 Wochen. Die DA-Wiederaufnahme wurde dagegen *in vivo* mit Hilfe der Continuous Potential Amperometry (CPA) gemessen. Mit dieser *in vivo* Technik ist eine zeitlich sehr hoch aufgelöste Erfassung des extrazellulären Konzentrationsverlaufs von DA im Striatum der Ratte möglich. Mit Hilfe mathematischer Modelle wurden die gemessenen Daten ausgewertet und die erhaltenen Parameter der transgenen Tiere mit denen einer nicht-transgenen Kontrollgruppe verglichen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Material und Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien

Substanz	Hersteller
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat x 12 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNeasy™ Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTP's	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dopaminhydrochlorid	Research Biochemicals International; Narick (MA), USA
Folin-Cioltateus-Phenolreagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
GBR 12909	Research Biochemicals International; Narick (MA), USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ (für PCR)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriummethyldiamintetraacetat (EDTA/Chelatkomplex III)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Octansulfonsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pargylin	Sigma, St. Louis (MO), USA
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Agarose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Life Technologies, Gaithersburg (MD), USA
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumkarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Humanes Serumalbumin	Germed, Dessau, Deutschland

Tab. 2: Zusammensetzung der McIlwain-Puffer für die Synaptosomensuperfusion (Normalpuffer)

Normalpuffer:	<ul style="list-style-type: none">• 128,7 mM Natriumchlorid• 1,7 mM Kaliumchlorid• 10,4 mM Dinatriumhydrogenphosphat x 12 H₂O• 1,3 mM Magnesiumsulfat x 7 H₂O• 11 mM Glucose• 1,1 mM Ascorbinsäure• 0,2 mM EDTA x 2 H₂O• 2,6 mM Kalziumchlorid• 0,125 mM Pargylin
---------------	--

Stimulationspuffer: 30mM Kalium (restliche Zusammensetzung wie Normalpuffer)

Tab. 3: Zusammensetzung der McIlwain-Puffer für die Synaptosomensuperfusion (Stimulationspuffer)**Tab. 4:** Zusammensetzung der McIlwain-Puffer für die Synaptosomensuperfusion (Aufnahmepuffer)

- Aufnahmepuffer: Zusammensetzung entspricht der des Normalpuffers bis auf folgende Bestandteile:
 - 130mM Natriumchlorid
 - 1,3 mM Kalziumchlorid
 - 2,2 Mm Ascorbinsäure

Alle Puffer wurden mittels verdünnter Natronlauge bzw. Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt.

Tab. 5: Zusammensetzung des Laufmittels für die HPLC (Angaben beziehen sich auf 1 l Aqua dest.)

- HPLC-Laufmittel:
 - 13,8g Dinatriumhydrogenphosphat x 1 H₂O = 0,1 M
 - 0,3028 g Octansulfonsäure = 1,4 mM
 - 0,372 g EDTA = 1mM
 - 30 g Isopropanol

Der pH-Wert des HPLC-Laufmittels wurde mit Phosphorsäure auf einen Wert von 3,4 eingestellt.

4.2 Tiere und Haltungsbedingungen

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet. Die Durchführung der Tierversuche wurde nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes von der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin genehmigt. Die voltammetrischen Untersuchungen wurden unter der Tierversuchsnummer TVV 193/98 genehmigt. Die übrigen Versuche bei denen die Tiere vor der Gewinnung des striatalen Gewebes getötet wurden, erhielten die Genehmigung über die Anzeige 195/98.

Für alle Versuche wurden Sprague Dawley Ratten verwendet. Die Tiere für die Kontrollgruppen wurden vom Züchter Schönwalde (Schönwalde, Deutschland) bezogen. Die 10 Monate alten transgenen Ratten für die voltammetrischen Untersuchungen wurden direkt von der Forschungsgruppe um Dr. Bader aus dem Max-Dellbrück-Zentrum in Berlin Buch bezogen. Die 9 Wochen alten Ratten wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie vermehrt. Die Elterntiere wurden ebenfalls vom Max-Dellbrück-Zentrum bezogen.

Die Haltung der Ratten erfolgte bis zum Versuch in Gruppen von 4-5 Tieren in Makrolon-Käfigen. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit Altromin 1324 (Altromin, Lage, Deutschland). Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 18 °C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Der Tag-Nacht-Zyklus wurde in zwölfstündigen Intervallen (Helligkeitsphase von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr) durch ein Lichtprogramm geregelt.

4.3 Methoden

4.3.1 Vermehrung der transgenen Ratten

Bei der Vermehrung wurden jeweils für das Gen der Antisense-m-RNA heterozygote Tiere mit Wildtypen des selben Stammes verpaart. Laut den Mendel'schen Regeln sollten nur 25% der Nachkommen heterozygot sein. Dies wurde auch durch die PCR-Untersuchungen der Nachkommenschaft bestätigt. Da nur Männchen in die Versuche einbezogen wurden, halbierte sich diese geringe Ausbeute nochmals. Dieser hohe Einsatz an Tieren machte es nötig, die Zahl der transgenen Versuchstiere auf ein Minimum zu beschränken.

4.3.2 Genotypisierung der Ratten

Bei der Erzeugung der transgenen Ratten wurden Wildtypen mit heterozygoten Tieren verpaart. Um bei den Nachkommen die transgenen Tiere von den Wildtypen unterscheiden zu können, mußte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht werden, ob sie das Gen für die Antisense-m-RNA besaßen oder nicht.

4.3.2.1 Gewinnung der genomischen DNA

Die Präparation der genomischen DNA erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Im Alter von ca. 4 Wochen wurden die Rattenwelpen von ihren Müttern abgesetzt. Ein ca. 1cm großes Stück der Schwanzspitze wurde abgeschnitten und in ein gekennzeichnetes Eppendorfgefäß überführt. Zusätzlich wurden 200 µl einer speziellen Pufferlösung des DNeasy Tissue Kit und 20 µl Protease ins Eppendorfgefäß pipettiert. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 55 °C in einem Eppendorf-Schüttler inkubiert. Dabei entstand eine visköse Lösung. Die in der Lösung enthaltene RNA wurde durch den Zusatz von 20 µl RNase enzymatisch gespalten. Weiterhin wurden 200 µl Puffer und 200 µl Ethanol hinzugefügt.

Die visköse Lösung wurde auf spezielle Säulen pipettiert. Diese wurden 3 Minuten bei

15.000 U/min (16.348 g) zentrifugiert. Die bei der Zentrifugation durch den in der Säule enthaltenen Filter getretene Flüssigkeit wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden zweimal jeweils 500 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und wieder abzentrifugiert. Die die DNA enthaltene Säule wurde 6 Minuten lang zentrifugiert, so daß der gesamte im Waschpuffer enthaltene Alkohol entfernt wurde.

Zur Herauslösung der genomischen DNA aus dem Filter wurden 10 µl einer speziellen Elutionslösung, die dazu auf 70 °C erhitzt wurde, auf die Säulen pipettiert. Nach 15 Minuten erfolgte die Zentrifugation. Auch dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Die DNA befand sich jetzt mit dem Puffer im Elutionsgefäß und konnte bis zur PCR bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

4.3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sollte herausgefunden werden, welche Tiere das Gen für die Antisense-m-RNA trugen und welche nicht. Nach den Mendel'schen Regeln war mit einem Anteil von 25 % heterozygoter Ratten zu rechnen.

Die Arbeitsgruppe um Dr. Bader aus dem Max Dellbrück Zentrum Berlin Buch stellte die Primer zur Verfügung, die nötig waren, um das Antisense Konstrukt im Genom der Ratten aufzuspüren. Ein solcher Primer besitzt die komplementäre Basensequenz des interessierenden Genabschnittes. Während der PCR lagert er sich an den Beginn des DNA-Bereichs an, der transkribiert werden soll und dient der Taq-Polymerase als Startpunkt für die Transkription. Die Taq-Polymerase transkribiert dann von diesem Startpunkt aus strangabwärts in 5'-3'Richtung bis sie ein Stoppsignal findet oder die Temperatur gesenkt wird. Um Fragmente von exakter Länge zu erhalten ist es aber notwendig dem Reaktionsgemisch einen zweiten Primer hinzuzufügen. Dieser zweite Primer lagert sich auf dem komplementären Strang der DNA am Ende des Bereichs ab, der transkribiert werden soll. Auch dort lagert sich die Taq-Polymerase an und beginnt mit der semikonservativen Replikation.

Bei der PCR werden die einzelnen Zyklen beendet, indem die Temperatur des Reaktionsgemisches auf 94 °C erhöht wird. Primer und Taq-Polymerase lösen sich von

den DNA-Strängen (denaturation), trotzdem bleibt die Taq-Polymerase intakt und kann bei geeigneter Temperatur ihre Funktion weiter ausüben. Danach wird die Temperatur auf 54 °C abgesenkt und die Primer lagern sich an ihre komplementären Sequenzen an (annealing). Danach wird die Temperatur auf 72 °C eingestellt und die Taq-Polymerase beginnt erneut mit der Transkription (elongation).

Bei diesem ersten Zyklus der Transkription entstehen noch keine Fragmente von exakt gleicher Länge. Es liegen jetzt Stränge vor, die einen definierten Startpunkt besitzen, jedoch kein definiertes Ende. Diese Stränge werden erst im zweiten Zyklus repliziert. An die im ersten Zyklus replizierten Stränge, die einen durch Primer 1 definierten Startpunkt haben, lagert sich nun Primer 2. Die Polymerase startet nun von Primer 2 aus mit der Replikation und endet zwangsläufig da, wo Primer 1 im ersten Zyklus angefangen hat, also der Strang endet, nun ist ein Fragment entstanden, daß eine durch beide Primer definierte Länge hat. In allen folgenden Zyklen werden jetzt immer exakt diese Fragmente amplifiziert und reichern sich in den Reaktionsgefäßen an. Diese angereicherten Fragmente können dann mittels Gelelektrophorese und Markierung durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden [Bitzan, 1996 #119]. Die Fragmente werden natürlich nur dann amplifiziert, wenn die Primer ihre komplementären Sequenzen finden, daß heißt, diese überhaupt im Reaktionsgefäß vorhanden sind. Nur bei den Ratten mit dem Gen für die Antisense-m-RNA kommt es also zur Amplifikation der Fragmente. Ein spezieller Puffer gewährleistet optimalen pH für die Reaktion. MgCl₂ wird von der Taq-Polymerase in exakter Konzentration benötigt. Nukleotide (dNTPs) werden durch die Taq-Polymerase zum neuen DNA-Strang zusammengefügt und müssen ausreichend vorhanden sein. Wasser ist das Medium in der die Reaktion abläuft. Es ist wichtig, strikte Sauberkeit einzuhalten, denn schon wenige eventuell von einer anderen Probe verschleppte DNA-Moleküle werden zu detektierbaren DNA-Mengen amplifiziert, die dann in der Gelelektrophorese als falsch positive Resultate gewertet werden würden.

Die Reaktionsgemische für die in dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurden folgendermaßen angesetzt:

Tab. 6: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsgemische

- 5µl Puffer
 - 1µl dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate)
 - 1,5 µl MgCl₂
 - 1 µl Primer (0,5 µl je Primer)
 - 2µl DNA-Probe
 - 40 µl H₂O (reinst)
-
- Gesamtvolumen pro Reaktionsgefäß: 50,5 µl

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde jeweils für alle Proben eine Mischung der Reagenzien außer der DNA-Probe hergestellt und 48 µl davon in jedes Reaktionsgefäß pipettiert. Danach wurden die Proben hinzugegeben. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Nach 33 der unten beschriebenen Zyklen wurden die Amplifikate bis zur Gelelektrophorese bei 4 °C gekühlt.

Tab. 7: Ablauf der qualitativen PCR

	Temperatur	Zeit
Denaturation	95 °C	20 min
Annealing	54 °C	20 min
Elongation	72 °C	40 min

4.3.2.3 Gelelektrophorese

Wie oben beschrieben, findet sich nur dann ein Amplifikat im Reaktionsgefäß, wenn das Gen für die Antisense-m-RNA im Genom der Ratte vorhanden ist. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine Gelelektrophorese in Agarosegel durchgeführt. Das 1 %ige Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist eine DNA-Interkalanz, das heißt es lagert sich in die Doppelhelixstruktur der DNA ein. Wird nun die

DNA unter ultraviolettem Licht betrachtet, kommt es zur Fluoreszenz. Auf diese Weise werden die bei der Elektrophorese entstehenden Banden unter UV-Licht sichtbar.

Die Gelelektrophorese nutzt die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aus. DNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode. Gleich große Fragmente wandern mit gleicher Geschwindigkeit und bilden Banden. Vor der Einbringung der Proben in die Gelkammern wurden die Proben mit 5 µl einer Substanz vermischt, die aufgrund ihres hohen Gewichtes ein Absinken der Proben bis auf den Boden der Gelkammern bewirkte.

Nach der Einbringung wurde eine Spannung von 100mV angelegt. Nach ca. einer halben Stunde Laufzeit war eine befriedigende Trennung der Proben erreicht und das Gel wurde unter ultraviolettem Licht fotografiert (Abb. 4).

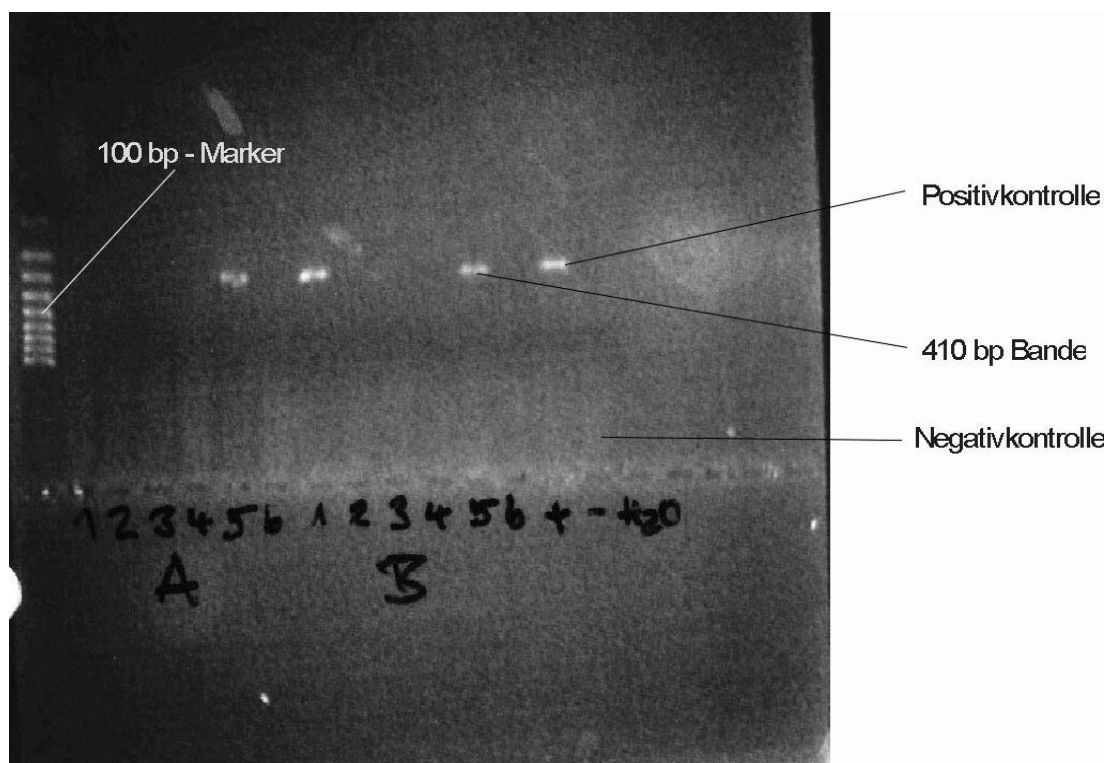


Abb. 4: Ultraviolett-Photographie einer Gelelektrophorese der PCR-Reaktionsgemische. Jede Gelkammer enthielt die Probe einer Ratte.

4.3.3 DA-Freisetzung *in vitro* an Synaptosomenpräparationen

4.3.3.1 Prinzip

Zur Quantifizierung der DA-Freisetzung wurden Synaptosomenpräparationen verwendet. Synaptosomen sind Partikel, die durch Homogenisierung und eine Reihe von Zentrifugationsschritten gewonnen werden (Abb. 5). In einem geeigneten Medium können diese Partikel, bestehend aus der präsynaptischen Terminale und der postsynaptischen Membran ihren Metabolismus für eine gewisse Zeit aufrechterhalten. Vorgänge wie: Wiederaufnahme, Freisetzung und Metabolismus lassen sich sehr gut mit Hilfe von Synaptosomen untersuchen [McMahon, 1991 #64].

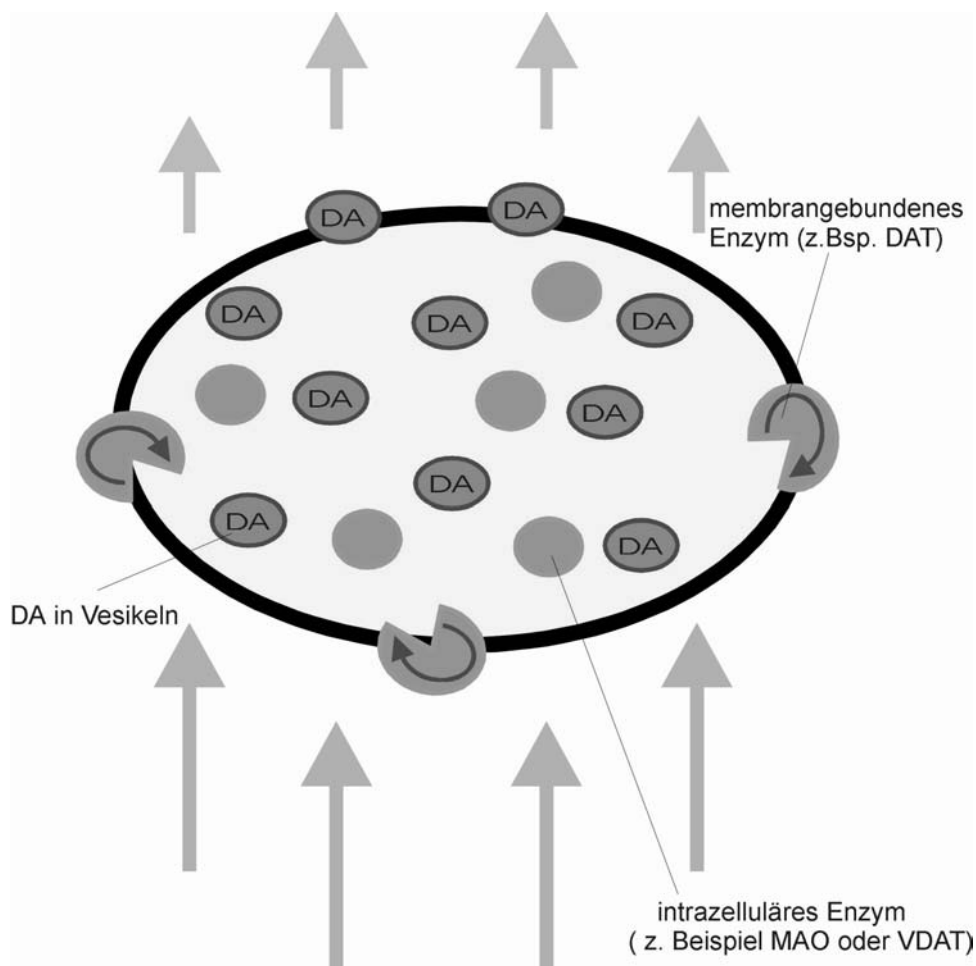


Abb. 5: Schematische Darstellung des präsynaptischen Anteils eines Synaptosoms

Mittels verschiedener pharmakologischer Stimuli wie z.B. K^+ oder elektrische Stimulation kann eine exozytotische Freisetzung von Transmitter aus den Synaptosomen ausgelöst

werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation mittels K^+ gewählt. Diese führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der DA-Freisetzung aus den Synaptosomen [De Belleruche, 1978 #42]. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, daß präsynaptische Rückspeicherung des freigesetzten Transmitters nahezu ausgeschlossen werden kann.

Da aufgrund des beim Synaptosom fehlenden Axons ein Aktionspotential über dieses nicht mehr zur präsynaptischen Terminale gelangen kann, muß die präsynaptische Membran auf andere Weise zur Freisetzung angeregt werden. Den Hauptanteil zur Aufrechterhaltung des positiven Membranpotentials trägt bei Synaptosomen, wie auch bei anderen erregbaren Strukturen, der hohe Kaliumgradient über die Zellmembran. K^+ liegt mit einer wesentlich höheren Konzentration im Intrazellulärraum vor. Eine Depolarisation, die zum Einstrom von Kalzium-Ionen und damit zur Auslösung der Freisetzungskaskade führt, kann auch durch eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration erreicht werden, da damit der Gradient relativ kleiner wird [McMahon, 1991 #64]. Die erreichte Depolarisation ist konstant und die Freisetzung erfolgt nicht wie unter physiologischen Bedingungen aufgrund einer Vielzahl einzelner Aktionspotentiale. Die Grenzen dieser Methode werden durch eine von Kawasaki beschriebene Schädigung der Synaptosomen deutlich. Jedoch kam es bei seinen Experimenten erst nach einer Stimulationsdauer von mehr als vier Minuten zu einer schweren Beeinträchtigung der Transmission [Kawasaki, 1988 #108]. Dieser Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit Rechnung getragen.

Viele Arbeiten zur Freisetzung von DA wurden mit Gewebspräparationen, die mit radioaktivem DA vorinkubiert wurden, durchgeführt. Die detektierte Radioaktivität wurde dann als Maß für die freigesetzte DA-Menge genommen. Es ist aber auch möglich, die Synaptosomen mit nicht radioaktiv markiertem DA zu inkubieren und dann die freigesetzte Menge mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography, High Pressure Liquid Chromatography) und elektrochemischer Detektion zu quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde keinerlei Vorinkubation vorgenommen. Durch Optimierung der HPLC-Technik konnten auch schon sehr geringe Mengen, wie sie bei der endogenen Freisetzung entstehen, detektiert werden. Dadurch werden eine Reihe von Problemen ausgeschlossen, wie sie bei der Vorinkubation entstehen. Um den sofortigen Abbau von DA zu verhindern, wurde allen zur Superfusion verwendeten Puffern Pargylin - ein Hemmstoff der Monoaminoxidase - zugesetzt. Weiterhin enthielten die

Superfusionspuffer Ascorbinsäure um die Autooxidation des DA zu vermindern.

4.3.3.2 *Synaptosomenpräparation*

Die unbehandelten Versuchstiere wurden dekapitiert und das Gehirn so schnell wie möglich aus dem knöchernen Schädel entfernt. Beide Striata wurden auf einer eisgekühlten Unterlage freipräpariert und nach der Bestimmung des Feuchtgewichtes in ein vorbereitetes eisgekühltes Homogenisierungsröhrchen gegeben, welches mit 0,5 ml Saccharoselösung gefüllt war. Die restliche benötigte Menge an Saccharoselösung wurde abhängig vom Feuchtgewicht zugegeben (20 Vol / mg Feuchtgewicht).

Die Striata wurden mit einem Teflon-Homogenisator (Neolab) mit einer Clearance von 100 µm in 3 Hüben homogenisiert. Dabei wurde auf eine möglichst gleichmäßige Auf- und Abbewegung des Glasröhrchens geachtet. Das so entstandene Homogenisat wurde nun zur Gewinnung der Synaptosomen zweimal bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge: MR1822 JOUAN, Saint Nazaire, Frankreich). Der bei 3.270 U/min (992 g) für 10 Minuten erhaltene Überstand, der die Synaptosomen enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 15.000 U/min (16.348 g) weitere 20 Minuten zentrifugiert. Dieser Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 1 ml Saccharose aufgespült und resuspendiert. 1200 µl der erhaltenen Synaptosomensuspension wurden nun in 1800 µl Aufnahmepuffer gegeben.

Daraufhin wurden die Synaptosomen "gewaschen", dh. je 1 ml der Synaptosomensuspension wurde über einem Glasfaserfilter (Whatman GF/A), der auf einem Papierfilter lag vakuumfiltriert. Der Filter wurde jeweils einmal vor und nach Applikation der Synaptosomen mit 1 ml Aufnahmepuffer gespült. Danach wurden die Filter entnommen und mit der die Synaptosomen enthaltenen Filterseite nach unten auf einen zweiten Papierfilter in die 6 Kammern der Superfusionsapparatur (Abb. 6) gebettet.

4.3.3.3 Synaptosomensuperfusion

Die verwendete Superfusionsapparatur (Eigenkonstruktion des Pharmakologischen Institutes) bestand aus 6 parallelen Kammern mit jeweils einem Zuführungsschlauch für Normal- und Stimulationspuffer. Über einen manuellen Umschalthebel konnte geregelt werden, welcher Puffer zugeführt wurde. Der Puffer wurde mit einer Superfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min über eine Schlauchpumpe zu einer Kammer transportiert, umspülte dort die Synaptosomen und gelangte anschließend in gekühlte 2 ml Eppendorfgefäße.

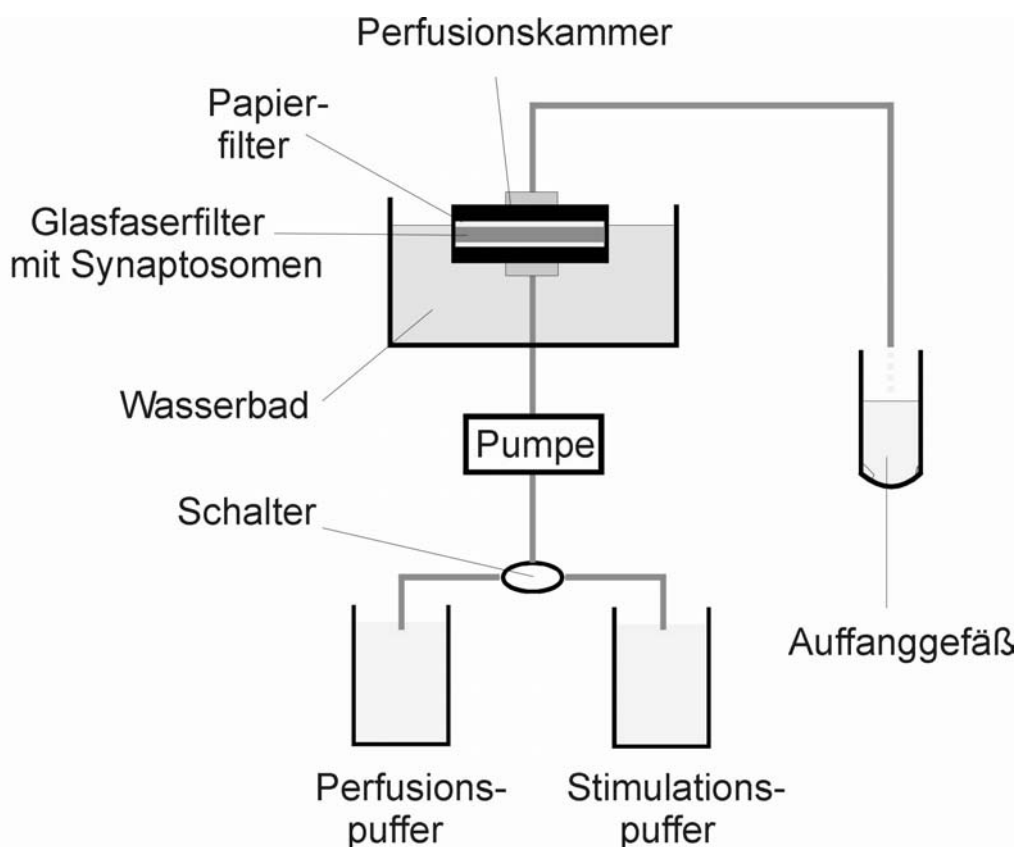
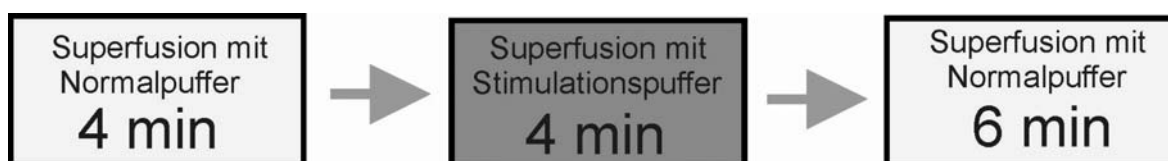


Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau bei den Versuchen zur DA-Freisetzung

Nach der Einbettung der Synaptosomen in die Kammern wurden diese verschraubt und in ein auf 37 °C vorgeheiztes Wasserbad gehängt. Für 12 Minuten wurde zunächst mit Normalpuffer gespült, bis sich die spontane DA-Freisetzung auf einen konstanten Basislevel eingestellt hatte. Danach wurden 2 Fraktionen des Superfusates in Eppendorfgefäße gesammelt. Die Sammelzeit der Superfusatfraktionen betrug jeweils 2 Minuten. Diese 2 ersten Fraktionen gaben Aufschluß über die basale DA-Freisetzung der

Synaptosomen. Nach Ablauf dieser 4 Minuten wurde das System auf Stimulationspuffer (K⁺ 30 mmol) umgeschaltet. Nach weiteren 2 Minuten wurde wieder auf den Standardpuffer umgeschaltet. Während der Stimulation und noch 10 Minuten im Anschluß daran wurden weitere Probenfraktionen, ebenfalls im 2 Minuten-Takt gesammelt. Am Ende erhielt man nach einem Stimulationsdurchlauf 7 Fraktionen. Diese wurden unmittelbar nach ihrer Gewinnung in den Kühlschrank (6 °C) überführt um eine Oxidation des DA so gering wie möglich zu halten. Erfolgte die Messung nicht am selben Tag wurden die Perfusate bei –80 °C eingefroren.



4.3.3.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach *Lowry et al.* [Lowry, 1951 #104] und diente bei der späteren Berechnung der induzierten DA-Freisetzung als Bezugswert zur verwendeten Gesamtmenge der Synaptosomen. Die tiefgefrorenen Synaptosomenfraktionen wurden zu gleichen Anteilen mit 1 molarer Natronlauge versetzt, um die Proteine zu denaturieren. 24 Stunden später wurden pro 500 µl Probe bzw. Eichlösung 2000 µl Lowry-Reagenz bestehend aus Kupfersulfatlösung, Kalium-Natrium-Tartratlösung und Dinatriumcarbonatlösung sowie 200 µl 1:1 verdünnter Folin-Reagenz unter sofortigem Schütteln zugegeben und eine Stunde lang im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion der Proteine mit der Lösung führte zu einer Blaufärbung, deren Farbintensität photometrisch bei einer Wellenlänge 660nm bestimmt wurde. Für die Erstellung der Eichkurve wurde der Reaktionslösung humanes Serumalbumin in definierten Konzentrationen zugesetzt.

4.3.3.5 Probenmessung mittels HPLC und elektrochemischer Detektion

Die HPLC ist eine Methode zur Trennung von Stoffgemischen, die in Form von Lösungen vorliegen. Dabei werden die Komponenten des Gemisches im Fall der in der vorliegenden

Arbeit verwendeten Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase, RP) zwischen einer stationären Phase und einer mobilen Phase verteilt [Meyer, 1999 #62]. Bei der Chromatographie an Umkehrphasen ist die Oberfläche der stationären Phase mit apolaren Gruppen chemisch modifiziert. Die mobile Phase ist in diesem Fall eine polare Flüssigkeit, meist ein Gemisch eines organischen Lösungsmittels und einer wäßrigen Pufferkomponente.

Im Fall der Analytik der Synaptosomenpräparation bestand die stationäre Umkehrphase aus einem mit Octadecylsilan (ODS) chemisch modifiziertem Kieselgel. Eine besondere Form der RP-HPLC stellt die Chromatographie unter Zusatz von Ionenpaarbildnern dar. Für die selektive Verlängerung der Retention von Kationen (DA liegt im sauren pH-Bereich als an der Aminofunktion protoniertes Molekül vor) werden dem Laufmittel Verbindungen zugesetzt, die eine anionische Gruppe (Sulfonsäure) und eine langkettige apolare Gruppe (Octylrest) besitzen. Die Ionenpaarbildner verteilen sich zwischen mobiler und stationärer Phase, wobei sich ein Konzentrationsgleichgewicht einstellt. Mit dem apolaren Rest bindet sich das Ionenpaarreagenz bevorzugt an die apolare Oberfläche der stationären Phase (ODS) und die polaren Gruppen weisen ins Innere der Lösung. Dadurch wird der Umkehrphase ein weiterer Trennmechanismus überlagert. Die im Superfusat vorhandenen Kationen, also im Falle der vorliegenden Arbeit DA, werden durch die Wechselwirkung mit den an der Oberfläche vorhandenen Anionen stärker gebunden und in ihrem Lauf durch die Säule verzögert.

Für die Analytik eines komplexen Gemisches wie dem Superfusat muß die zu bestimmende Komponente so von den anderen Bestandteilen getrennt werden, daß sie als eindeutiger Peak dargestellt wird und nicht von anderen Komponenten überlagert wird. Die zur Chromatographie verwendete Säule wies folgende Spezifikationen auf:

- Typ: Spherisorb ODS-2, 125mm x 4mm, 3µm (Chromatographie Technik GmbH, Berlin, Deutschland)
- Korngröße: 3 µm
- Länge: 125 mm, innerer Durchmesser 4,0 mm

Zur Lösung des Trennproblems wurden die Komponenten der wäßrigen mobilen Phase folgendermaßen optimiert (Angaben bzw. auf 1 l Laufmittel) :

- Dinatriumhydrogenphosphat x 1 H₂O: 13,8 g = 0,1 M
- Octansulfonsäure-Natriumsalz: 0,3028 g = 1 mM
- EDTA-Dinatriumsalz: 0,372 g = 1 mM
- Isopropanol: 30 g
- Phosphorsäure zum Einstellen des pH-Wertes

Dabei beeinflussen sich die Komponenten in der mobilen Phase auch wechselseitig, so führt z. B. eine Erhöhung der Konzentration von Isopropanol nicht nur zur gewünschten Verkürzung der Analysendauer, sondern beeinflusst auch die Lage des Ionenpaargleichgewichtes. Eine Erhöhung des pH-Wertes im Laufmittel führt zu kürzeren Retentionszeiten für die in der Probe enthaltenen Säuren und eine höhere Konzentration an Ionenpaarbildner zu einer längeren Elutionszeit der Basen.

Der pH-Wert der mobilen Phase wird auf 3,5 eingestellt, damit die restliche Silanolaktivität des Basiskieselgels unterdrückt wird und die Stickstoffbasen protoniert vorliegen. Dadurch verläuft die Autooxidation des DA langsamer. EDTA bindet Schwermetallkationen, welche die Oxidation des DA katalysieren. Das Laufmittel wurde mit einer Pumpe RHEOS 4000 (Flux Instruments, Karlskoga, Schweden) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min über die Säule gepumpt. Dabei stellte sich ein Druckabfall über der Säule von etwa 130 bar ein.

Zur Detektion von Katecholaminen ist die elektrochemische Detektion an einer amperometrischen Dünnschichtmeßzelle wegen ihrer hohen Sensitivität besonders gut geeignet. Dabei werden die oxidierbaren Komponenten des Eluats, ähnlich wie bei der später noch beschriebenen CPA, durch ein konstantes Oxidationspotential an einer Glassy Kohlenstoffelektrode oxidiert und der dabei fließende Strom aufgezeichnet. Zur Gewährleistung eines konstanten Potentials der Glassy Kohlenstoffelektrode gegenüber der Lösung wurde eine Dreielektrodenanordnung mit einer Ag/AgCl Referenzelektrode verwendet. Das an die Arbeitselektrode angelegte Potential wurde mit Hilfe eines Potentiostaten (dem elektrochemischen Detektor) konstant gehalten und betrug 0,9 V gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode.

Die Detektion erfolgte mit einer Meßzelle vom Typ Biometra EP30 und einem Detektor vom Typ BCMA JND-II (ERC, Alteglofsheim, Deutschland). Die Empfindlichkeit des Detektors wurde auf 2 nA/V eingestellt. An den Ausgang des Detektors war ein chromatographisches Datenauswertesystem (Barspec Chrom-A-Dat 100, Rehovot, Israel) angeschlossen, mit dem die Bestimmung der Peakflächen erfolgte.

Die eingefrorenen Proben wurden unmittelbar vor der Messung aufgetaut und mit einem manuellen Probenaufgäbeventil vom Typ Rheodyne 7725 (USA) mit einer Probeschleife von 100 µl auf die HPLC-Säule aufgetragen.

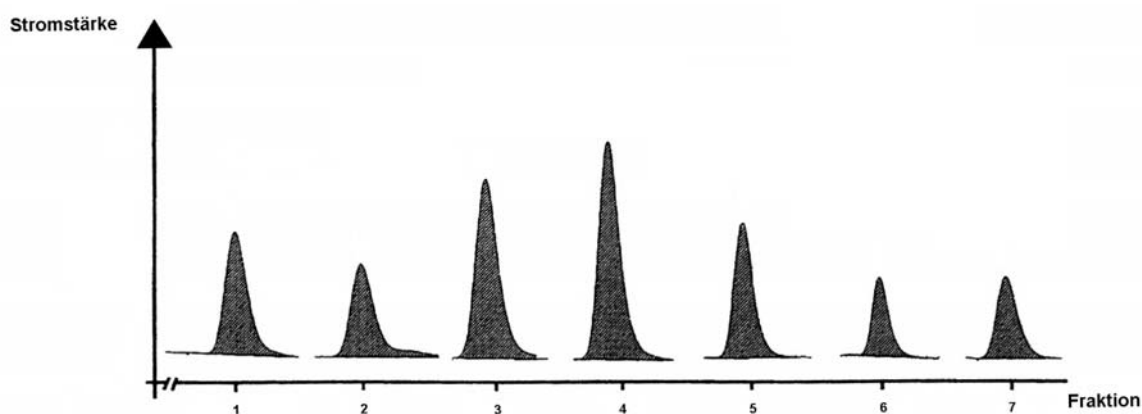


Abb. 7: Schematische Darstellung von DA-Peaks wie sie bei der HPLC der Perfusate erhalten wurden.

4.3.3.6 Auswertung

Die Bestimmung der Konzentration an DA in den Proben erfolgte nach einer Tageseichkurve mit externer Standardisierung. Dazu wurden DA-Standards einer Konzentration von 10^{-8} mol/l verwendet, die unmittelbar vor der Messung aufgetaut wurden. Um dem unterschiedlichen Synaptosomengehalt der Filter Rechnung zu tragen, wurde die erhaltene DA-Konzentration mit der Proteinmenge pro Filter verrechnet, so daß die erhaltenen Werte in nmol DA / mg Protein in die statistische Endauswertung eingingen. Bei einigen Basalproben konnte trotz wiederholter Messungen kein Signal detektiert werden. Es wurde daher angenommen, daß der DA-Gehalt dieser Proben unter dem

Detektionslimit lag. Diese Proben erhielten einen Konzentrationswert von 0,8 nmol DA / mg Protein zugeordnet, der als Detektionslimit angenommen wurde.

Kam es während des Versuches zu einem Abfall der Flußgeschwindigkeiten, bzw. verstopfte die Zu- oder Ableitung einer Superfusionskammer, dann wurde diese Kammer nicht bei der Auswertung berücksichtigt. Ein konstanter Fluß ist Voraussetzung für valide Konzentrationswerte. Würde der Fluß des Superfusionspuffers beispielsweise während des Versuches bei konstanter Freisetzung der Synaptosomen abnehmen, dann käme es zu einer Erhöhung der DA-Konzentration in den Perfusaten. Dies würde dann eine Erhöhung der Freisetzung der Synaptosomen vortäuschen.

4.3.4 Bestimmung der DA-Wiederaufnahme *in vivo*

4.3.4.1 Prinzip amperometrischer Meßverfahren

Mit Hilfe voltammetrischer Meßverfahren lassen sich oxidierbare Substanzen nachweisen. DA stellt eine solche Substanz dar (Abb. 8). Wird an eine Arbeitselektrode ein Potential angelegt, so können an ihrer Oberfläche Substanzen entsprechend ihrem Redoxpotential oxidiert werden und einen Elektronenstrom erzeugen. Dieser läßt sich als Funktion der Zeit darstellen. Das bei voltammetrischen Meßverfahren benutzte Meßsystem besteht idealerweise aus drei Elektroden:

- Arbeitselektrode
- Referenzelektrode
- Hilfelektrode

Das zur Oxidation der zu detektierenden Substanz benötigte Potential wird zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode angelegt. Die Applikation des Potentials geschieht mit Hilfe eines Potentiostaten. Durch das angelegte Potential kommt es zu einem Strom, welcher mit Hilfe eines im Potentiostaten integrierten Strom / Spannungswandlers in eine Spannung umgewandelt wird. Diese Spannung wird an ein Oszilloskop zur graphischen Darstellung weitergegeben und kann nach Digitalisierung des Signals zur

Datenverarbeitung gespeichert werden.

Wird nun DA an die Oberfläche der Arbeitselektrode herangeführt, kommt es zur Oxidation des Moleküls. Die dabei pro Molekül DA abgegebenen 2 Elektronen erhöhen den Stromfluß durch die Elektrode. Dieser ist direkt proportional zur Menge des oxidierten DAs. Eine Hilfselektrode wird dazu verwendet, das Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode konstant zu halten. Da unter *in vivo* Bedingungen, die über die Referenzelektrode abfließenden Ströme sehr gering sind, kann ohne Inkaufnahme größerer Meßfehler diese mit der Gegenelektrode zusammengefaßt werden [Justice, 1987 #60]. So wurde auch in dieser Arbeit vorgegangen.

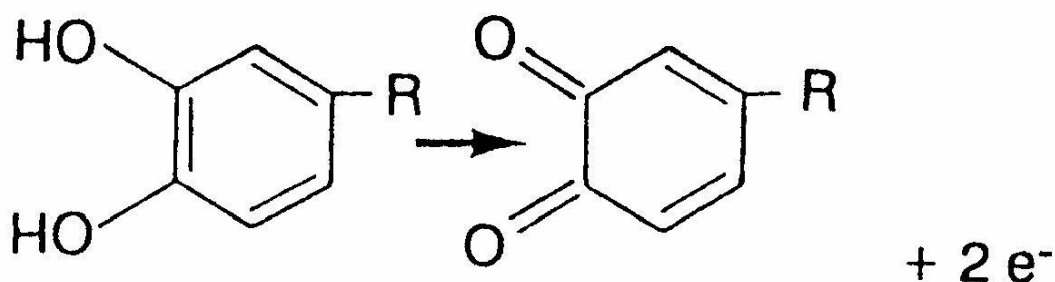


Abb. 8: Oxidation von DA

Es gibt eine Reihe voltammetrischer Meßverfahren, die das Potential in Form bestimmter Pulsmuster applizieren. Zu diesen zählen die Chronoamperometrie, die Normalpulsvoltammetrie, die Differentialpulsvoltammetrie und noch einige andere mehr. Einige dieser Verfahren sind relativ selektiv im Bezug auf die untersuchte Substanz.

4.3.4.2 Continuous Potential Amperometry (CPA) mit unbehandelter Kohlefaserelektrode

In dieser Arbeit wurde die CPA, die auch als Continuous Amperometry bzw. Kontinuierliche Amperometrie bezeichnet wird, verwendet. Sie wurde von mehreren Autoren als geeignete Methode zur Messung stimulierter DA-Freisetzung *in vivo* eingesetzt [Chergui, 1994 #120] [Dugast, 1994 #43]. Sie unterscheidet sich von den

gepulsten Verfahren dadurch, daß ein konstantes Potential von +400mV zwischen Arbeitselektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode angelegt wird. Das Verfahren ist vom Prinzip her nicht selektiv für DA, besitzt jedoch den entscheidenden Vorteil einer sehr hohen Zeitauflösung. Vorgänge, die im Bereich weniger Mikrosekunden stattfinden, lassen sich mit dieser Methode nachvollziehen. Dadurch ist es möglich, den sehr schnell ablaufenden Vorgang der stimulierten Transmitterfreisetzung und –wiederaufnahme selektiv gegenüber den langsamen Metabolitenveränderungen zu erfassen. Dahingegen liegt die höchste Auflösung gepulster Meßverfahren, wie z.B. der Differenz-Puls-Voltametrie (DPV) im Bereich von Minuten.

Eine Vorbehandlung der Kohlefaserelektrode zur Selektivitätssteigerung ist für die CPA nicht nötig. Die Gründe dafür werden in Abschnitt 6 diskutiert.

4.3.4.3 Versuchsaufbau

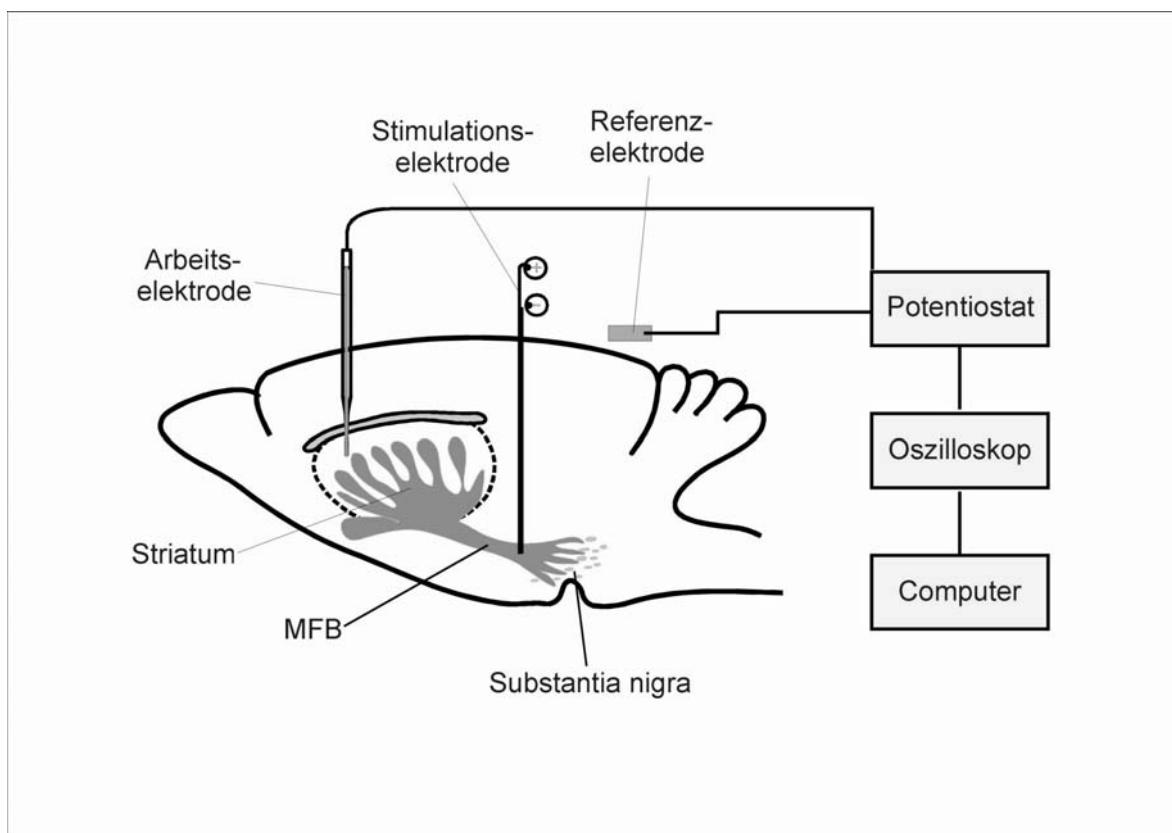


Abb. 9: Schematischer Versuchsaufbau für die Versuche zur hochaffinen DA-Wiederaufnahme

Abb. 9 zeigt schematisch den Versuchsaufbau, wie er im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei den voltammetrischen Untersuchungen zum Einsatz kam.

Es wurden ein Potentiostat (AMU 130, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) zur Applikation des Potentials und ein Oszilloskop (54601A Oscilloscope, Hewlett Packard) zur Sichtbarmachung und Digitalisierung des Meßsignals verwendet. Die am Oszilloskop digitalisierten Daten wurden an einen Computer weitergegeben und dort als Reihe von Wertepaaren (Zeit, Spannung) in einer Datei abgelegt, die später ausgewertet wurde.

4.3.4.4 Elektrodenherstellung

Die zur CPA verwendeten Kohlefaserlektroden (Abb. 10) wurden in Eigenarbeit hergestellt. Hierzu wurden in Borosilicat Glaskapillaren (Durchmesser außen: 2mm, innen 1,16mm; Clark Electromedical Instruments, Reading, UK) Kohlefäden (Durchmesser 7 μm , Goodfellow, Cambridge, UK) eingeführt. Um die dabei hinderlichen Adhäsionskräfte zu minimieren, wurden die Kapillaren vorher mit Ethanol gefüllt.

Danach wurden die Elektroden in einem Elektrodenziehgerät mittels eines gewendelten Glühfadens und einem Gewicht ausgezogen. Bei diesem Vorgang wurde der Kohlefaden in die sich verschmälernde Kapillare eingeschmolzen. An der Schmelzstelle riß die Kapillare durch den Zug des Gewichtes ab und es stand ein längeres Stück Kohlefaser über. Die freiliegende Kohlefaser wurde unter dem Mikroskop auf eine Länge von 300 μm (Toleranz $\pm 30 \mu\text{m}$) zugeschnitten. Längenunterschiede der Kohlefaser führen zu Unterschieden in der Höhe des Meßsignals bei gleicher DA-Konzentration. Dieser wurden durch die Eichung korrigiert.

In das offene hintere Ende der so entstandenen Elektrode wurde eine Kupferlitze eingeführt, die mit einem Goldstecker verlötet ist. Die Verbindung zwischen Kohlefaser und Kupferlitze wurde mittels eines Silberleitlackes hergestellt, in den das Ende der Litze kurz vor dem Einführen in die Elektrode getaucht wurde. Zum Schluß wurde zwecks Verschuß des offenen Endes und zur Fixierung des Kabels an der Kapillarwand ein Tropfen Cyanoacrylat an die Austrittsstelle des Kabels gegeben. Die Lagerung erfolgte

erschütterungsarm in einem gut geschützten Behältnis bis zum Einsatz.

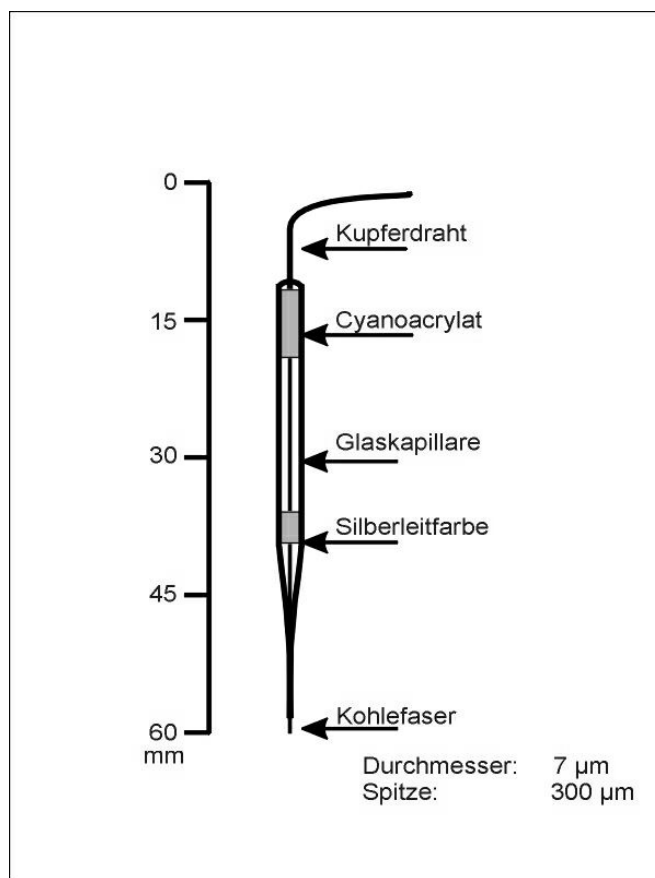


Abb. 10: Schematische Darstellung einer Meßelektrode.

4.3.4.5 Eichung

Die Elektroden wurden vor jedem Versuch geeicht. Einige Autoren eichen auch nach dem Versuch, da das von den Elektroden gelieferte Signal nachweislich während des Versuches leicht abnimmt. Da dies jedoch bei allen Versuchen gleichermaßen geschah, die Messungen nach genauem Zeitplan abliefen und evtl. beim Herausziehen der Elektrode haften gebliebene Rückstände die Nacheichung stark verfälscht hätten, wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet.

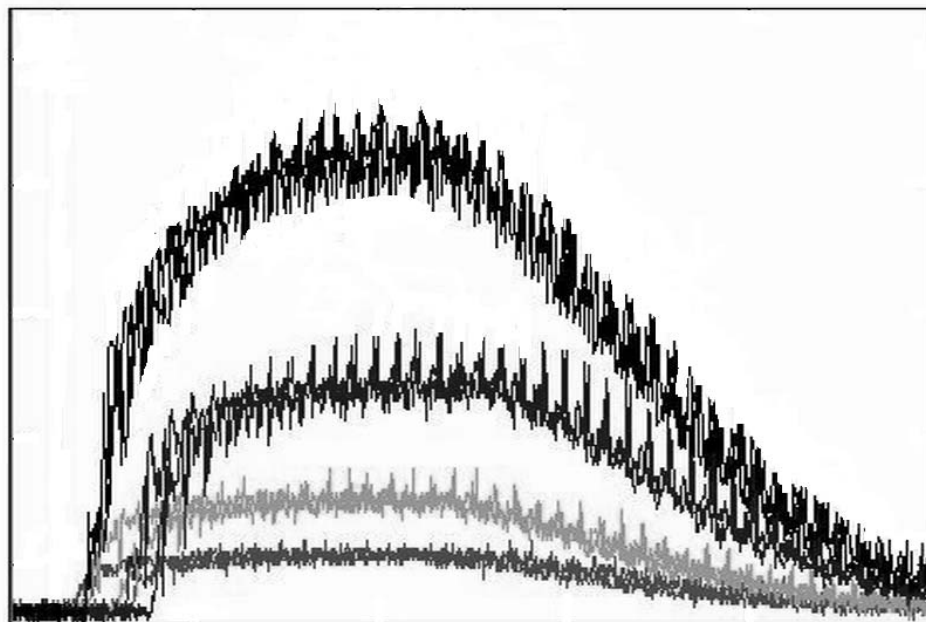


Abb. 11: Übereinanderprojektion der verschiedenen bei der Eichung erhaltenen Konzentrationsverläufe (rot: 125 nmol DA, grün: 250 nmol DA, blau: 500 nmol DA, schwarz: 1 µmol DA)

Durch eine Präzisionspumpe (Flux Instruments, Karlskoga, Schweden) wurde die in ein offenes Schlauchende eingeführte Elektrode mit Phosphat-Puffer-Kochsalzlösung (PBS) umspült. Mittels eines Probeaufgabeventils (Rheodyne, USA) wurde DA in Konzentrationen zu 125 nM, 250 nM, 500 nM und 1 µM in aufsteigender Reihenfolge an die Elektrode herangeführt. Für jede Konzentration wurden 2 Kurven aufgezeichnet, an denen man jeweils die Grundlinie, den Anstieg und das Plateau des Meßsignals sehen und auswerten konnte (Abb. 11).

Mittels eines Mathematik-Programms (Mathcad 4.0, Mathsoft, Cambridge (MA), USA) wurde ein Eichfaktor in µmol/mV berechnet. Dies geschah, indem jeweils die Abstände zwischen Grundlinie und Plateau der einzelnen Messungen auf eine Kurve aufgetragen wurden und dann der Anstieg für diese Kurve bestimmt wurde.

4.3.4.6 Stereotaktische Implantation der Elektroden

Die Tiere wurden mit Chloralhydrat narkotisiert (400mg/kg i.p.). Die Narkosetiefe wurde während des gesamten Versuches anhand des Kornealreflexes überwacht. Bei ungenügender Narkosetiefe wurden, meist im Abstand von einer Stunde, weitere Injektionen kleiner Dosen Chloralhydrat verabreicht. Nach Eintritt einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Kopfhaut geschoren. Danach wurde das Tier in einer stereotaktischen Vorrichtung (David Kopf Instruments, USA) fixiert. Der Höhenunterschied zwischen den Spitzen der in den Meatus acusticus externus eingeführten Ohrstifte zur Auflagefläche der Maxilla betrug 3,3 mm.

Nach großzügiger Entfernung der Galea wurde die Kalotte freipräpariert und das Bregma durch eine Markierung hervorgehoben. Ausgehend von dieser Markierung wurden dann entsprechend dem Atlas von *Paxinos* [Paxinos, 1986] folgende Koordinaten verwendet:

Tab. 8: Koordinaten zur Plazierung der Elektroden

Koordinaten für die Arbeitselektrode: (Striatum)	anterior:	1,0 mm
	lateral:	2,5 mm
	ventral:	4,5 mm
Koordinaten für die Reizelektrode: (Mediales Vorderhirnbündel)	posterior:	4,3 mm
	lateral:	1,5 mm
	ventral:	7,0 mm

Über den Koordinaten für die Elektroden wurde die Kalotte mittels eines Dentalbohrers trepaniert. Der Durchmesser der Öffnung betrug etwa 3-4 mm. Nach Entfernung der Knochenfragmente konnten die Hirnhäute vorsichtig entfernt werden. Danach wurde der Ort der Arbeitselektrodenimplantation sorgfältig von Verunreinigung wie Blut, Fibrin oder Knochenfragmenten gereinigt.

Die bipolare gabelförmige Stimulationselektrode (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK) wurde ausgehend von der Hirnoberfläche 7 mm in ventraler Richtung ins Hirngewebe vorgeschoben und an dieser Position vorerst belassen. Danach begann die Implantation der Meßelektrode. Bei diesem Arbeitsgang mußte besonders vorsichtig

vorgegangen werden, da die nur 7 μm dicke Kohlefaser sehr leicht abbrechen konnte. Deshalb war es wichtig, daß die Hirnoberfläche am Implantationsort völlig frei von Resten der Hirnhäute und anderen Verunreinigungen war. Jede Verunreinigung der Elektrodenoberfläche verändert deren elektrochemische Eigenschaften und beeinflußt so die Messergebnisse in unvorhersehbarer Weise.

Nach der Einbringung sowohl der Reiz- als auch der Meßelektrode wurde das Tier mit der stereotaktischen Vorrichtung in einen Faraday-Käfig überführt in dem alle Messungen stattfanden. Die Ag/AgCl-Referenzelektrode (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK) wurde ein Stück unter die Galea geschoben und mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer permanent durchfeuchtet. Alle Meßapparaturen und auch die stereotaktische Haltevorrichtung wurden geerdet.

Nach Anschluß der Meßelektrode und Applikation des Potentials von +400 mV kam es zunächst zu einem kontinuierlichen Abfall der gemessenen Stromstärke. Dies kann damit erklärt werden, daß anfänglich in der unmittelbaren Umgebung der Meßelektrode, die in hoher Konzentration vorliegenden oxidierbaren Substanzen oxidiert wurden. Nach einigen Minuten verarmt die Umgebung an diesen Substanzen und sie müssen aus immer größerer Entfernung herandiffundieren. Der Strom stellt sich auf eine relativ stabile Linie ein, weil sich ein Gleichgewicht zwischen Herandiffusion und Oxidation herausbildet. Die Messungen wurden erst nach Eintreten dieses Gleichgewichtes, d.h. nach ca. 10 Minuten, begonnen.

Um eine größtmögliche DA-Ausschüttung zu erreichen, wurde die Stimulationselektrode langsam in 200 μm -Schritten and das MFB vorgeschoben. Nach jedem Vorschub wurde eine kleine Stimulation ausgelöst und das Signal auf dem Oszilloskop beobachtet, bis ein maximales DA-Signal zu sehen war. In dieser Position wurde die Elektrode dann während des gesamten Versuches belassen. Nach Beendigung der Messung wurde das Tier mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet.

4.3.4.7 Messung

Um die DAT-vermittelte hochaktive Wiederaufnahme von DA selektiv zu bestimmen, wurden die Messungen jeweils vor und nach Verabreichung von GBR 12909, einem hochselektivem Blocker des DAT [Matecka, 1996 #20] durchgeführt. Da das Experiment ausschließlich das Ziel hatte, die Eigenschaften des DAT zu charakterisieren, konnten problemlos unphysiologisch hohe Stimuli verabreicht werden. Dies war sogar notwendig, da eine Sättigung des DAT auch ohne Blockade durch GBR 12909 erreicht werden sollte

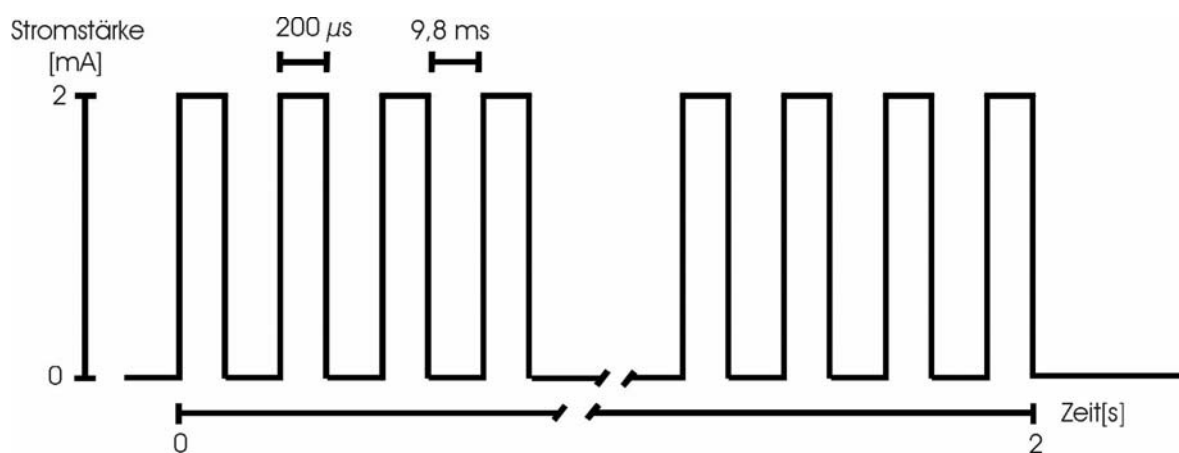


Abb. 12: Schematische Darstellung der bei der Stimulation des MFB applizierten Pulse

Pro Meßzyklus wurden je 7 Kurven (Abb. 13) aufgezeichnet. Die Stimulationsparameter waren wie folgt:

Tab. 9: Stimulationsparameter

- Impulsanzahl: 200
- Impulsfrequenz: 100 Hz
- Stromstärke: 2 mA
- Einzelimpulslänge: 200 μ s
- Zeit zwischen den Einzelimpulsen: 9,8 ms

Nach bzw. noch während der Stimulation kam es erwartungsgemäß zu einer sehr hohen DA-Ausschüttung im Striatum der Ratten.

Die aufgezeichneten Kurven zeigten eine lineare und nachfolgend eine exponentielle Komponente. Im linearen Bereich der Kurve arbeitet der DAT mit maximaler Kapazität, so daß von einer Kinetik 0. Ordnung ausgegangen werden konnte. Sank die Konzentration des Transmitters im synaptischen Spalt unter eine gewisse Grenze, nahm die Kurve einen exponentiellen Verlauf. Der Transporter arbeitete von jetzt an nach einer Kinetik 1. Ordnung.

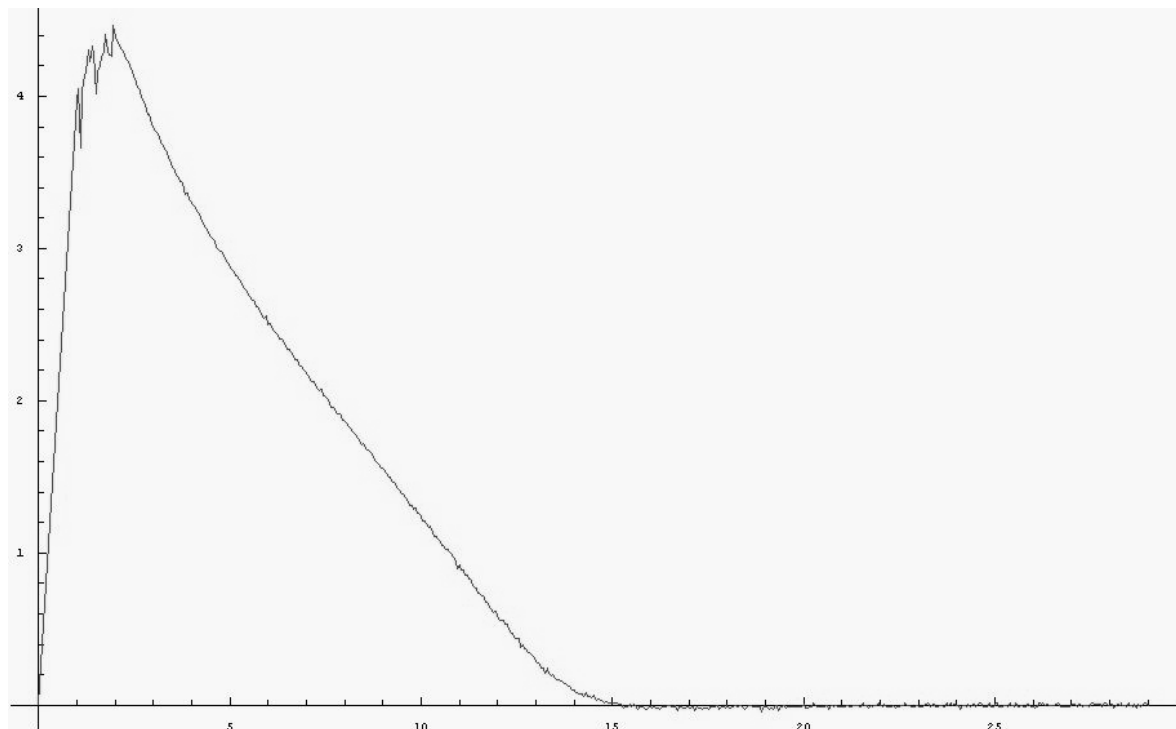


Abb. 13: Meßkurve nach Stimulation mit 200 Impulsen nach der Gabe von GBR 12909.

Zwischen den Stimulationen wurden jeweils 5 Minuten Pause gelassen, damit sich die Speicherpools wieder erholen konnten. Bei einzelnen Tieren konnte beobachtet werden, daß der Anstieg der Kurve schon während der Stimulation schwächer wurde oder gar abbrach. Dabei gab es starke interindividuelle Unterschiede. Es wurden solche Tiere für die Berechnung verwendet, bei denen eindeutig ein linearer Anteil der Kurve zu sehen war.

Nach Aufzeichnung der 7. Kurve wurde zur Hemmung des DAT GBR 12909 verabreicht (20mg/kg/Körpergewicht, i.p.). Zum Zwecke der Resorption, Verteilung und Bindung der

Substanz wurde nach der Applikation eine Pause von 30 Minuten gewährt. Danach wurde erneut ein Stimulationszyklus, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die dabei aufgezeichneten Kurven waren wesentlich höher und breiter als die vor der Gabe von GBR 12909. Der Grund dafür war, daß der DAT nicht mehr für die Entfernung von DA aus dem synaptischen Spalt zur Verfügung stand und deshalb nur noch Prozesse wie unselektive Wiederaufnahme, Diffusion, Oxidation (durch die Meßelektrode) und Abbau für die Änderung der Konzentration an der Elektrode verantwortlich sein konnten.

4.3.4.8 Auswertung

Um die erhaltenen Kurven zu charakterisieren wurden zwei verschiedene mathematische Modelle benutzt. Ein einfaches Modell (Modell 1), bei dem ohne Zuhilfenahme von Eichfaktoren gerechnet wird, war in der Planungsphase der Arbeit zur Auswertung vorgesehen. Dabei wird jedoch nur der exponentielle Teil der Kurve ausgewertet. Es wurde hier verwendet, um eine Vergleichbarkeit mit Daten aus der zuvor schon angesprochenen eng verwandten Arbeit, bei der nach neurotoxischer Läsion voltammetrische Messungen an Ratten vorgenommen wurden, zu gewährleisten.

Während die Versuche zur vorliegenden Arbeit schon durchgeführt wurden, wurde am Institut ein neueres Modell (Modell 2) entwickelt, das auch den linearen Teil der Kurve in die Berechnung mit einbezieht. Dieses Modell benötigt Eichfaktoren zur Berechnung. Da die Versuche mit den 10 Monate alten Ratten schon im Gange waren und die dabei verwendete Eichung nicht exakt genug für das neue Modell war, wurden nur die Ergebnisse der 9 Wochen alten Tiere auch mit diesem Modell ausgewertet.

4.3.4.8.1 Modell 1

Hierbei werden die gemessenen Kurven mit einer Geschwindigkeitskonstanten k beschrieben. Das Modell geht, wie oben erwähnt von einem exponentiellen Verlauf der Konzentrationsänderung von DA nach der Ausschüttung aus. Dies trifft jedoch nur für die unteren Kurvenbereiche zu (Abb. 14).

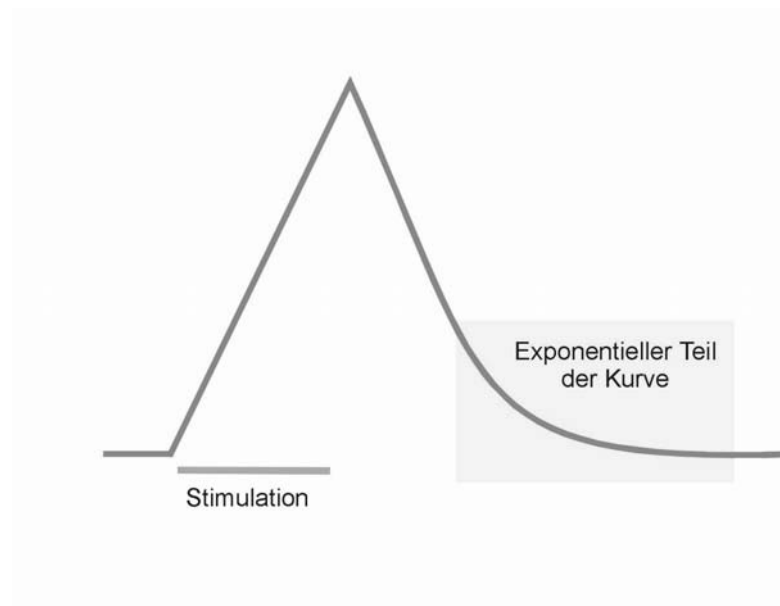
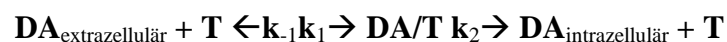


Abb. 14: Schematische Darstellung einer Meßkurve.

Die Messungen wurden wie schon erwähnt jeweils vor und nach der Gabe von GBR 12909 durchgeführt. Die 7 Kurven eines Stimulationszyklus wurden gemittelt und die erhaltene Kurve dann ausgewertet.

Der Rückgang der extrazellulären DA-Konzentration ist ein Prozeß, der sich aus verschiedenen Anteilen zusammensetzt. So wird davon ausgegangen, daß eine hochaffine DA-Wiederaufnahme von anderen Prozessen abgrenzbar ist, welche die extrazelluläre Konzentration von DA verringern [Justice, 1988 #17] [Near, 1988 #78] [Wightman, 1990 #79]. Zu diesen Prozessen zählen Diffusion, Metabolisierung und Aufnahme in Gliazellen.

Die hochaffine Aufnahme ist ein Vorgang pseudo-erster-Ordnung. Es gilt folgender Zusammenhang:



DA = DA-Konzentration

T = Anzahl der DA-Transporter

DA/T = DA/DA-Transporterkomplex

k_x = jeweilige Geschwindigkeitskonstante

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dabei ist die Dissoziation des DA/DA-Transporterkomplexes.

Auch die anderen Prozesse, die zur Konzentrationsverringering im Extrazellulärraum beitragen, können in erster Näherung als Prozesse erster Ordnung bezeichnet werden. Der Zusammenhang ist folgender:

$$DA_{\text{extrazellulär}} \xrightarrow{k_p} M$$

k_p = Geschwindigkeitskonstante für
andere DA-Beseitigungsprozesse

M = Konzentration der Metabolite

Die gemessene DA-Clearance-Kurve kann einer Kurve pseudo-erster Ordnung angepaßt werden.

$$-\{ d[DA_{\text{extrazellulär}}] / dt \} \text{ Aufnahme} = k [DA_{\text{extrazellulär}}]$$

Die bei der Kurvenanpassung erhaltene Geschwindigkeitskonstante k setzt sich aus den beiden oben beschriebenen Teilgeschwindigkeitskonstanten k_2 und k_p zusammen.

$$k = k_2 [T] / k_m + k_p$$

Die Kurvenanpassung erfolgte mittels eines für Mathematica 4.0 (Wolfram Research, Champaign, Illinois, USA) erstellten Programms. Ein Maß für die dabei erreichte Präzision ist die Fehlerquadratsumme. Nachdem das Programm ein Minimum für die Fehlerquadratsumme gefunden hatte, begann es einen Punkt weiter auf der Kurve erneut mit der Kurvenanpassung. Die berechnete und die tatsächliche gemessene Kurve konnten graphisch aufeinanderprojiziert dargestellt werden. Nach Erreichen eines höchstmöglichen Grades an Übereinstimmung der gemittelten Meßkurve mit der berechneten Kurve (Abb. 15) wurde der erhaltene k -Wert für die Charakterisierung der Kurve zur weiteren Berechnung festgehalten.

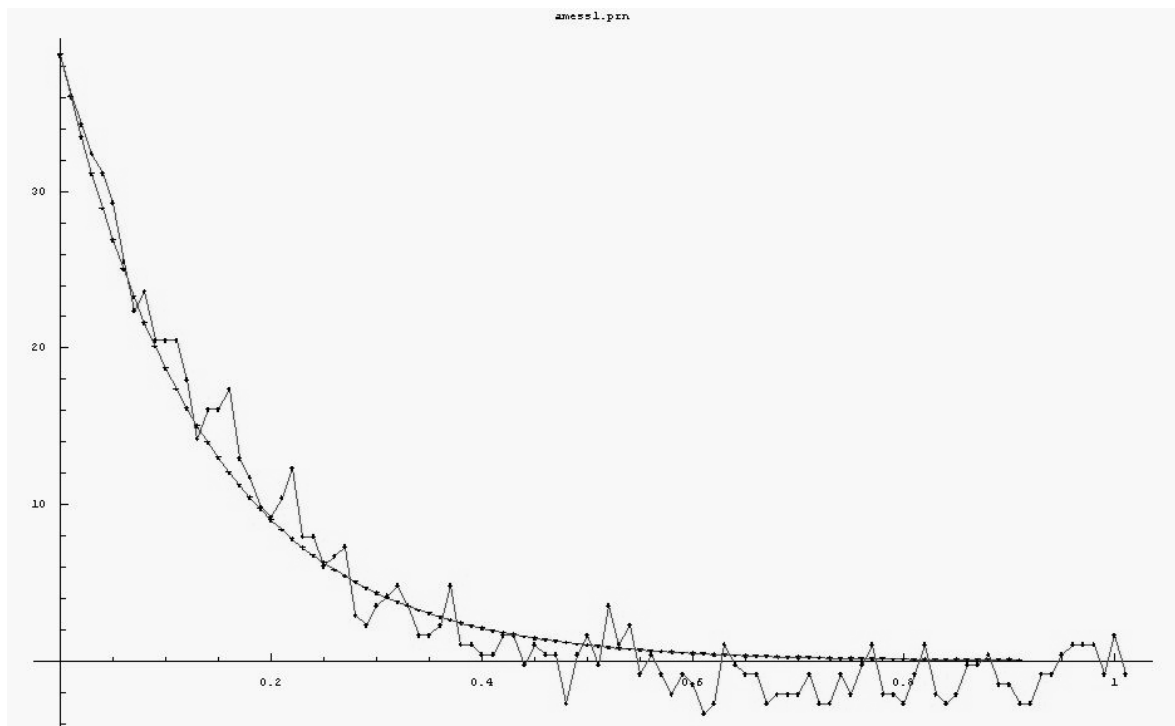


Abb. 15: Aufeinanderprojektion vom unteren Bereich der Meßkurve (starke Streuung) und mit Modell 1 berechneter Kurve (glatte Kurve).

Der für k nach Gabe von GBR 12909 erhaltene Wert wurde von k vor Gabe von GBR 12909 subtrahiert. Somit wurde die hochaffine DA-Wiederaufnahme von den anderen Prozessen zur Reduktion von DA aus dem Extrazellarraum differenziert.

$$k_{\text{DAT}} = k_{\text{vor GBR 12909}} - k_{\text{nach GBR 12909}}$$

4.3.4.8.2 Modell 2

Modell 1 trifft, wie schon erwähnt, nur auf den exponentiellen Kurvenbereich zu. Wie der Vergleich von Abb. 15 (Auswertung mit Modell 1) und Abb. 16 (Auswertung mit Modell 2) verdeutlicht, wird bei Modell 2 ein wesentlich größerer Kurvenabschnitt in die Auswertung mit einbezogen. Modell 2 berücksichtigt auch den linearen Teil der Kurve, das heißt den Teil, der die Phase der Wiederaufnahme repräsentiert, in welcher der DAT mit maximaler Geschwindigkeit arbeitet.

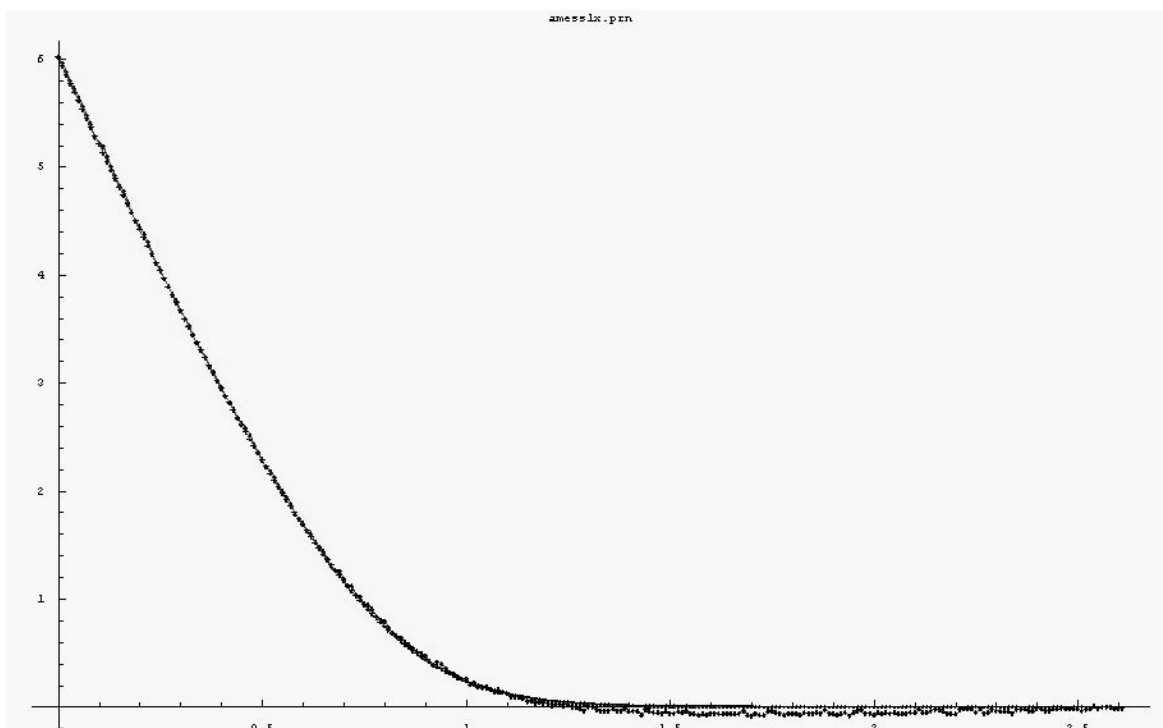


Abb. 16: Aufeinanderprojektion von berechneter und Meßkurve (exponentieller und linearer Anteil) bei Berechnung mit Modell 2.

Mit Hilfe des Programms „Mathematica 4.0“ wurde eine Kurvenanpassung unter Zugrundelegung einer Michaelis-Menten-Kinetik vorgenommen. Die Gleichung wurde nach dem v_{\max} -Wert aufgelöst. Um eine möglichst hohe Präzision bei der Kurvenanpassung zu erreichen, wurde die Fehlerquadratsumme minimiert. Die erhaltenen v_{\max} -Werte in $\mu\text{mol}/\text{sec}$ waren nicht dimensionslos, wie die k -Werte von Modell 1. Aus diesem Grunde war eine genaue quantitative Eichung der Elektrode nötig. Aus der Eichung ging ein Eichfaktor mit der Dimension $\mu\text{mol}/\text{mV}$ hervor, der in die Berechnung des v_{\max} -Wertes einbezogen wurde. Die so erhaltenen v_{\max} -Werte gingen in die Endauswertung ein.

Das mathematische Modell wurde von Dr. Schönfuß am Institut für Pharmakologie und Toxikologie entwickelt. Ein noch weiter ausgereiftes Modell, daß die gesamte Kurve inklusive der Stimulation in die Berechnung miteinbezieht wurde im Journal of Neuroscience Methods veröffentlicht [Schönfuß, 2001 #110].

5 Ergebnisse

5.1 Genotypisierung der Ratten

Bei der PCR der genomischen DNA der Ratten, welche die Gensequenz für die Antisense-m-RNA besaßen, kam es zur Amplifikation eines Fragmentes von 410 Basenpaaren Länge. War die Gensequenz im Genom nicht vorhanden, kam es zu keiner Amplifikation. An der Formung einer Bande war eindeutig zu erkennen, ob das entsprechende Tier die DNA für die Antisense-m-RNA besaß oder nicht (Abb. 4) Tiere bei deren aufbereiteter DNA sich eine Bande formte, wurden der Gruppe der heterozygoten Tiere zugeordnet.

5.2 Untersuchungen zur synaptosomalen DA-Freisetzung *in vitro*

5.2.1 Vergleich der Absolutwerte

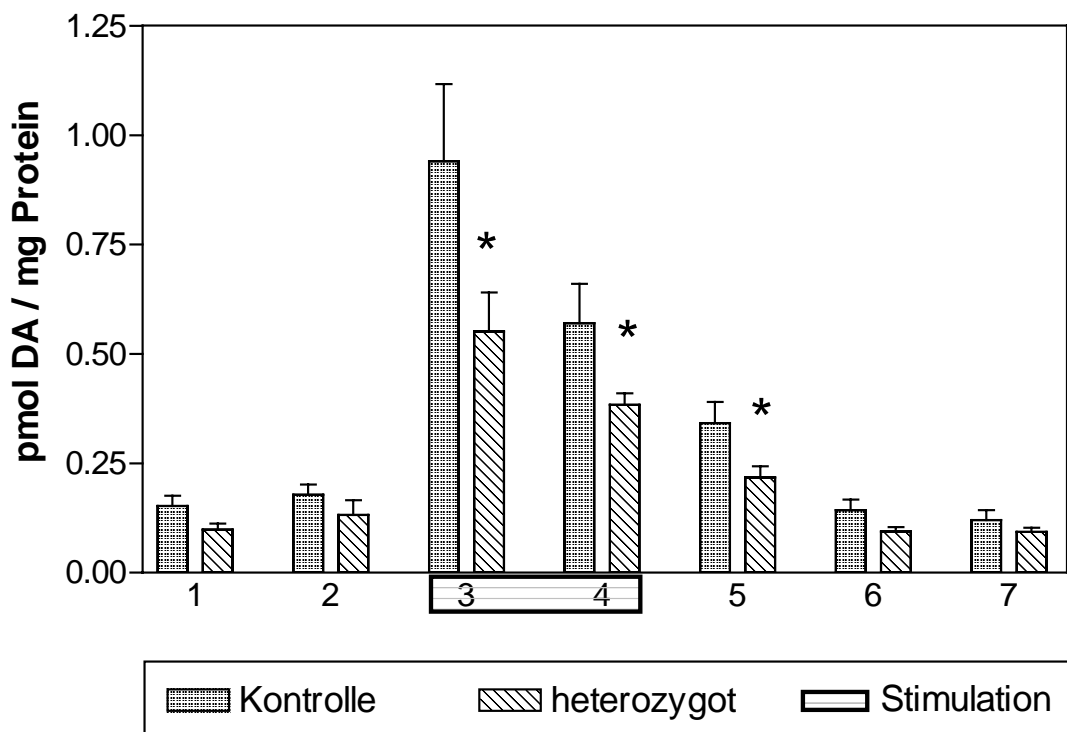


Abb. 17: DA-Freisetzung aus Synaptosomen, Vergleich der einzelnen Perfusatfraktionen von transgenen Tieren (n=7) mit Kontrolltieren (n=9), (*: P < 0,05 Mann-Whitney-U-Test), aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM)

Es wurden die synaptosomale DA-Freisetzung einer Gruppe von Tieren die positiv für das Gen der Antisense-m-RNA gegen die m-RNA der TPH waren, im Folgenden als „heterozygot“ bezeichnet, mit der Kontrollgruppe aus Tieren des gleichen Stammes verglichen.

Die Fraktionen wurden im Abstand von 2 Minuten gesammelt. Fraktionen 1 und 2 stellten Basiswerte dar. Nach der 2. Fraktion wurde für 4 Minuten mit 30 mmol K⁺ stimuliert (schraffiertes Kästchen in Abb. 17). Somit stellten 3. und 4. Fraktion Stimulationswerte dar. Nach der Stimulation wurde wieder mit Normalpuffer superfundiert.

Die heterozygoten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren in den Fraktionen 3,4 und 5 eine signifikant niedrigere DA-Freisetzung. Die Basiswerte und die letzten beiden Fraktionen unterschieden sich nicht signifikant. Es war jedoch festzustellen, daß die DA-Basisfreisetzung der Synaptosomen der transgenen Tiere im Mittel in allen Fraktionen niedriger war als die der Kontrolltiere (Abb. 17).

Da eine Normalverteilung der Ergebnisse nicht vorlag und es sich um eine kleine Stichprobe handelte, wurde ein nichtparametrischer Test zur Auswertung herangezogen (U-Test nach Mann und Whitney). Dabei errechneten sich für den exakten p-Wert hinsichtlich einer zweiseitigen Signifikanz folgende Werte:

Tab. 10: p-Werte der einzelnen Fraktionen

	p-Wert
Fraktion 3	0,039
Fraktion 4	0,030
Fraktion 5	0,039

Für alle anderen Fraktionen war der p-Wert höher als 0,05.

5.3 Untersuchungen zur DA-Wiederaufnahme *in vivo*

5.3.1 k-Werte

Zur Berechnung der k-Werte waren keine Eichfaktoren nötig. Die Kurven wurden in ihrem exponentiellen Anteil an eine Kinetik 1. Ordnung angepaßt und eine Geschwindigkeitskonstante k mit der Dimension $1/s$ berechnet. Es wurden sowohl 10 Monate alte Ratten als auch 9 Wochen alte Ratten in die Auswertung einbezogen.

5.3.1.1 *k*-Werte für alle DA-Eliminationsvorgänge

Aus dem exponentiellen Teil der berechneten Mittelwertskurven wurde k für die Gesamtheit aller Eliminationsvorgänge berechnet. Hier konnten auch die Tiere in die Berechnung einbezogen werden, die nach Applikation von GBR 12909 verstarben. Deshalb kann hier die Anzahl der in die Gruppen aufgenommenen Tiere größer sein als bei der Berechnung von k für die hochaffine Wiederaufnahme (Abb. 20 und 21).

5.3.1.1.1 9 Wochen

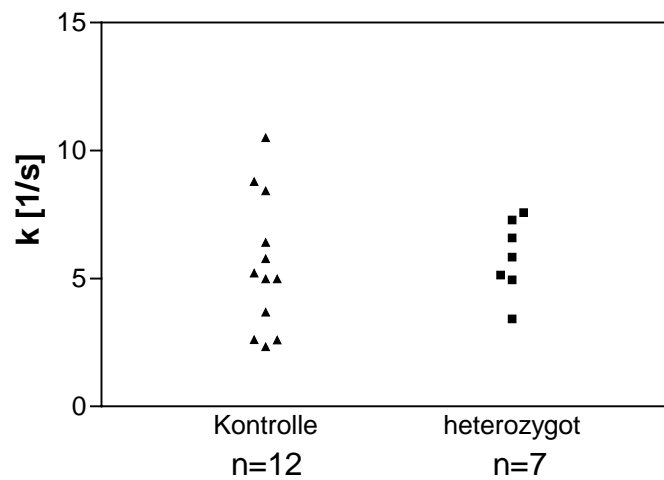


Abb. 18: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der 9 Wochen alten Versuchsgruppen für die Gesamtheit der Eliminationsvorgänge von DA aus dem Extrazellulärraum. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.1.1.2 10 Monate

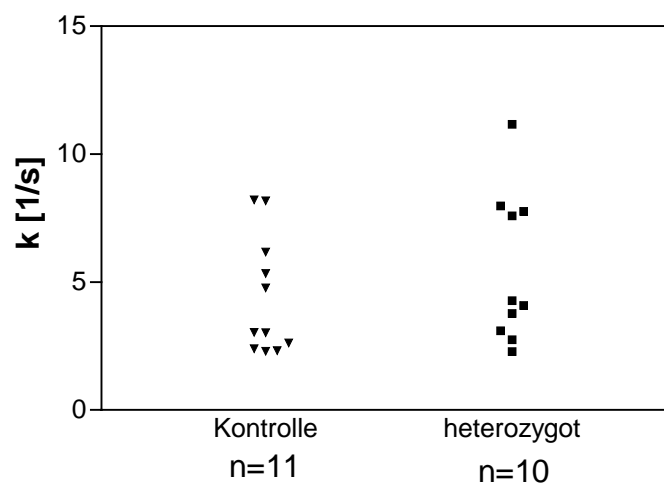


Abb. 19: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der 10 Monate alten Versuchstiere für die Gesamtheit der Eliminationsvorgänge von DA aus dem Extrazellulärraum. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.1.2 *k*-Werte für hochaffine Wiederaufnahme

5.3.1.2.1 9 Wochen

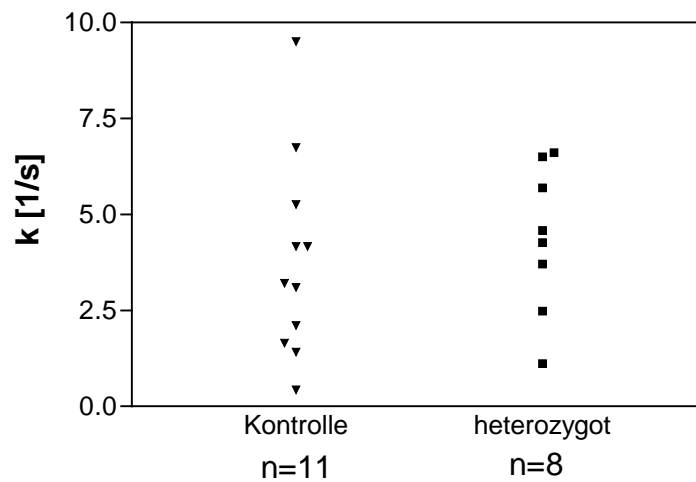


Abb. 20: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der 9 Wochen alten Versuchstiere für die hochaffine DA-Wiederaufnahme. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.1.2.2 10 Monate

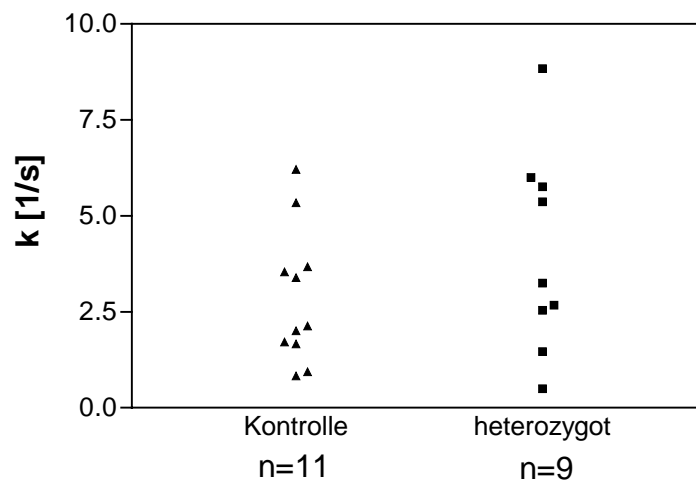


Abb. 21: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der 10 Monate alten Versuchstiere für die hochaffine DA-Wiederaufnahme. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.2 v_{\max} -Werte

Zur Berechnung der v_{\max} Werte wurde das neu entwickelte Rechenmodell (Modell 2) benutzt. Dafür war es notwendig die Elektroden vor der Messung exakt zu eichen. Diese exakte Art der Eichung wurde aber erst nach Abschluß der Versuche mit den 10 Monate alten Tieren eingeführt, so daß diese hier nicht mit in die Auswertung eingehen.

5.3.2.1 v_{\max} -Werte für alle DA-Eliminationsvorgänge

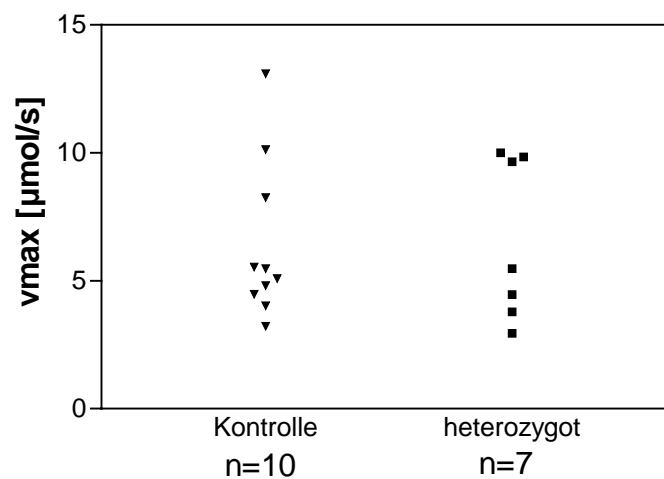


Abb. 22: Vergleich der v_{\max} -Werte der 9 Wochen alten Versuchstiere. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.2.2 v_{\max} -Werte für hochaffine Wiederaufnahme

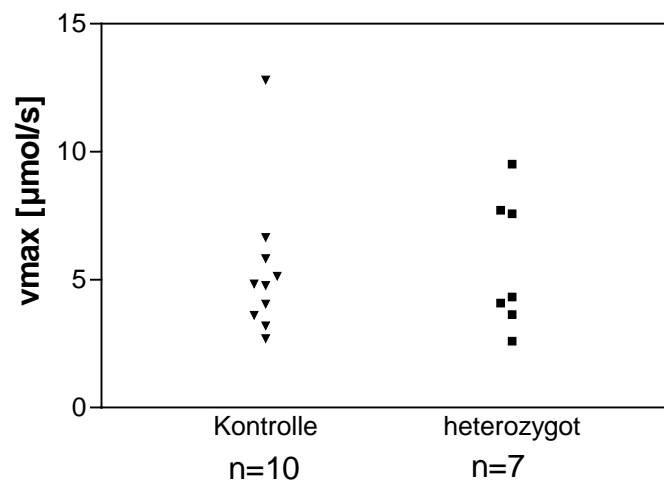


Abb. 23: Vergleich der v_{\max} -Werte der 9 Wochen alten Versuchstiere. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.3 Altersvergleich

5.3.3.1 Kontrolltiere

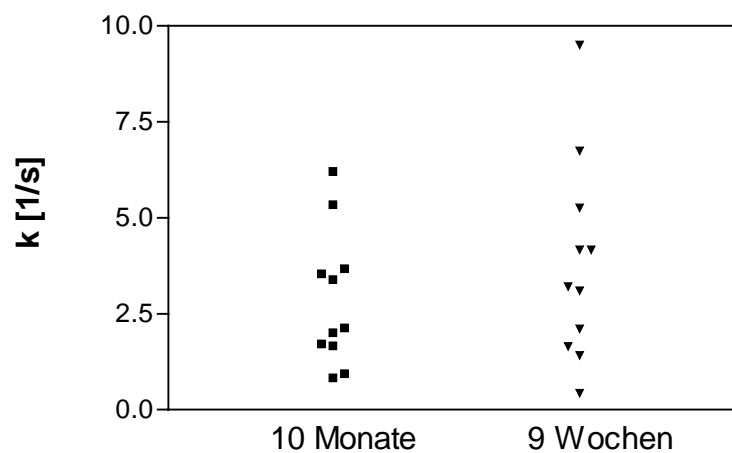


Abb. 24: Vergleich der beiden Altersgruppen der Kontrollgruppen. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.3.2 Heterozygote Tiere

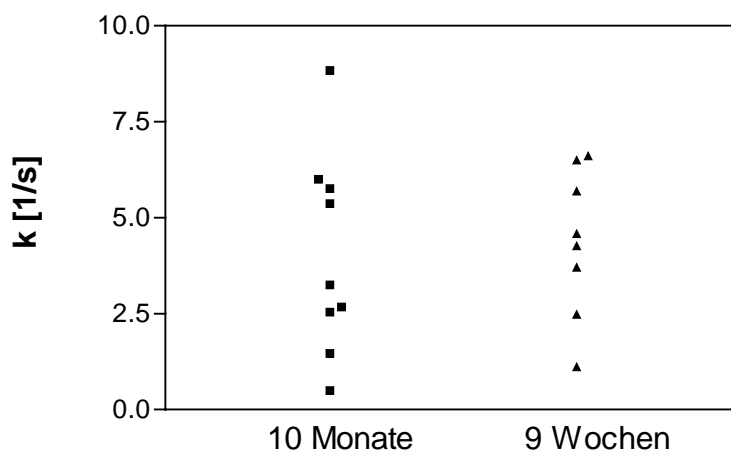


Abb. 25: Vergleich der beiden Altersgruppen der heterozygoten Tiere. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

5.3.4 Zusammenfassung

Die voltammetrischen Untersuchungen zur DA-Wiederaufnahme konnten keinen Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen feststellen. Weder die k -Werte und v_{\max} -Werte für die Gesamtheit der DA-Eliminationsvorgänge noch die für die hochaffine DA-Wiederaufnahme ließen einen Unterschied zwischen Ratten mit dem Gen für die Antisense-m-RNA gegen die m-RNA der TPH und Kontrolltieren des gleichen Stammes erkennen. Altersabhängige Veränderungen konnten ebenfalls nicht festgestellt werden. Wie die Abbildungen 20 bis 24 verdeutlichen, wurden erhebliche interindividuelle Unterschiede der k - und v_{\max} -Werte vorgefunden.

6 Diskussion

6.1 Wirkung des Transgens

Durch einen Eingriff in das Genom der Ratte wurde das serotonerge System verändert. Das Ziel der genetischen Manipulation war die TPH, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serotoninbiosynthese katalysiert. Durch die Einfügung von spezifischen Sequenzen die für Antisense-m-RNA kodieren, läßt sich die Expression von Proteinen lebenslang unterdrücken bzw. verringern. So gelang es durch die Einfügung einer Antisense-RNA gegen die m-RNA des Proteins Angiotensinogen, dessen Expression im Gehirn um 90% zu reduzieren. Dies führte zu signifikanten Verminderungen des Blutdrucks und der Trink-Response auf eine Renininfusion [Schinke, 1998 #52].

Die Verabreichung von Antisense-Nukleotiden in das Ventrikelsystem von Mäusen führte zu einer signifikanten Verringerung der Aktivität der TPH. Diese Effekte waren vergleichbar mit PCPA-Infusionen [McCarthy,1995 #22]. PCPA ist ein irreversibler Hemmstoff der TPH. Dies spricht dafür, daß sich auch die TPH durch Antisense-Nukleotide hemmen läßt. Somit kann vermutet werden, daß die Ratten, die das Gen für die Antisense-m-RNA trugen, Beeinträchtigungen der TPH aufwiesen.

Die Gesamt-Serotonin-Konzentration im Hirngewebe der transgenen Ratten, die das Gen für die Antisense-m-RNA trugen, wurde im Vorfeld der Versuche bestimmt. Es fand sich eine tendenzielle Erniedrigung, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte [Versuchsreihe dazu wurde am Max-Dellbrück-Zentrum Berlin Buch durchgeführt]. Die Gesamt-Serotoninbestimmung ist eine Methode, die nur ein grobes Maß zur Charakterisierung des serotonergen Systems darstellt. Sie kann als Momentaufnahme aufgefaßt werden und sagt nichts über die tatsächliche funktionelle Verfügbarkeit des Neurotransmitters aus. Ein passagerer Serotoninmangel, z.B. in Zeiten der intrauterinen Entwicklung der Ratte, läßt sich mit dieser Methode nicht erfassen. Auch wird mit Hilfe dieser Methode keine Aussage über die Verteilung von Serotonin innerhalb verschiedener Speicherkompartimente gemacht. So wird von zwei verschiedenen Serotoninspeicherpools innerhalb der serotonergen Nervenendigung ausgegangen, die sich in der Art der Freisetzung des Transmitters unterscheiden.

Es ist wahrscheinlich, daß trotz verringerter Anzahl der TPH-Moleküle unter normalen Umständen noch genug Transmitter synthetisiert werden kann, um einen normalen Gesamtserotoninspiegel aufrecht zu erhalten. So ist bekannt, daß die TPH unter physiologischen Bedingungen nicht gesättigt ist, so daß von einer erheblichen Funktionsreserve dieses Enzyms unter normalen Umständen ausgegangen werden kann. Auch wird vermutet, daß die Verringerung der Serotonin-Konzentration zu einer Hoch-Regulation der Expression des TPH-Gens führt. Jedoch ist ungewiß, ob die Hochregulation den Verlust an TPH-Molekülen durch die Antisense-m-RNA vollständig ausgleichen kann [Park, 1994 #27]. Der Defekt kann sich also sowohl auf die funktionelle Verfügbarkeit des Transmitters ausgewirkt haben oder kommt nur in Zeiten erhöhten Serotoninbedarfs zum Tragen.

Als Indiz für die Wirkung des Antisense-Konstruktes kann der Fakt gewertet werden, daß es bei der Kreuzung heterozygoter Ratten nicht gelang, homozygote Nachkommen zu erhalten. Dies hätte nach den Mendel'schen Regeln in 25 % der Nachkommenschaft der Fall sein müssen. Auch nach Kreuzung einer hinreichend hohen Zahl von heterozygoten Tieren, fanden sich keine homozygoten Nachkommen. Serotonin spielt in der Embryonalentwicklung eine sehr wichtige Rolle [Khozhai, 1995 #46] [Walther, 2000 #61] und ist unter anderem an der Zelldifferenzierung, der Induktion von Axonwachstum und der Koordination der Migration von Nervenzellen in ihre Zielgebiete beteiligt [Rubenstein, 1998 #103]. Durch eine starke oder vollständige Behinderung der Expression der TPH, wie sie bei einem homozygoten Vorhandensein des Gens vermutet werden kann, kommt es wahrscheinlich zu schweren Beeinträchtigungen der Embryonalentwicklung und somit zum intrauterinen Absterben des Embryos.

Es konnten in der vorliegenden Arbeit Veränderungen des dopaminergen Systems bei den genetisch manipulierten Ratten festgestellt werden. Da die Manipulation bei den transgenen Ratten selektiv am serotonergen System vorgenommen wurde, muß die beobachtete Veränderung am dopaminergen System auf Änderungen in diesem System zurückgeführt werden. Es ist unwahrscheinlich, daß die beobachtete Verringerung der DA-Freisetzung durch andere Wirkungen der Antisense-m-RNA zustande gekommen ist. Jedoch kann dies auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. So wurde beschrieben, daß Antisensenukleotide trotz ihrer hohen Spezifität an anderen Orten Wirkungen entfalten, die dann zu Misinterpretationen führen können [Crooke, 1998 #65]. Trotzdem

wird in Antisense-Nukleotiden ein wirkungsvolles, zukünftiges Werkzeug in der selektiven Beeinflussung von Systemen gesehen, gerade aufgrund ihrer hohen Selektivität.

6.2 Methodik

6.2.1 Untersuchungen zur DA-Freisetzung *in vitro*

Synaptosomenpräparationen ermöglichen das Studium von Vorgängen wie Transmitterfreisetzung und Wiederaufnahme in einer experimentell gut kontrollierbaren *in vitro* Situation. In einem geeigneten Medium können Synaptosomen ihren Metabolismus für mehrere Stunden aufrechterhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde selektiv die K⁺-stimulierte synaptosomale DA-Freisetzung gemessen.

6.2.2 Untersuchungen zur DA-Wiederaufnahme *in vivo*

Für die *in vivo*-Untersuchung der DAT-Funktion bieten sich prinzipiell 2 Methoden der Erzeugung einer hohen extrazellulären lokalen DA-Konzentration an, deren zeitlicher Abfall (Clearance) einen Hinweis auf die DAT Funktion gibt. Dies ist entweder eine lokale Mikroapplikation von DA in die Nähe der voltammetrischen Elektrode oder die Stimulation des MFB, die ebenfalls eine hohe DA-Konzentration im Hirngewebe in Elektrodennähe hervorruft. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation des MFB gewählt. Die elektrische Stimulation des MFB führt zur Erregung der mit diesem Faserbündel ins Vorderhirn ziehenden Axone. Dadurch werden Aktionspotentiale generiert, die in den Zielgebieten der Projektionen zu einer exozytotischen Transmitterfreisetzung führen. Dopaminerge Neurone sind nicht die einzigen Zellen, die Axone durch das MFB entsenden. Es finden sich unter anderem auch serotonerge und cholinerge Axone. Es liegt nahe anzunehmen, daß auch die darin enthaltenen Transmitter bei der Stimulation des MFB ausgeschüttet werden. Um eine höhere Selektivität der Messungen zu gewährleisten, wurde der selektive DAT-Hemmer GBR 12909 eingesetzt und die durch GBR 12909 erzeugte Differenz der k- bzw. v_{max}-Werte berechnet.

Unabhängig davon verdient das Problem der Co-Ausschüttung anderer detektierbarer Neurotransmitter eine besondere Beachtung. Es wurde in einer Arbeit von *Dugast* ausführlich behandelt. Er zeigte unter Zuhilfenahme verschiedener Pharmaka, daß es sich bei dem Signal nach Stimulation des MFB um ein ausschließlich durch DA bedingtes Signal handelte. Der Kurvenverlauf verhielt sich nach Verabreichung der Substanzen, zu denen z.B. hochselektive Blocker der DA-Wiederaufnahme gehörten, stets so, wie es bei einem dopaminergen Signal zu erwarten gewesen wäre. So wurde ein größerer Peak bei Gabe von Pargylin (MAO-Hemmer), Nomifensin (Hemmer der DA-Wiederaufnahme) und Haloperidol (blockt unter anderem präsynaptische D2-Autorezeptoren) beobachtet. Auch die mögliche Verfälschung des Signals durch eine eventuelle parallel erfolgende Serotonin- oder Noradrenalin ausschüttung ließ sich widerlegen. Die Verabreichung von Desipramin (Noradrenalinwiederaufnahmehemmer) und Sertralin (Serotoninwiederaufnahmehemmer) führte zu keiner Vergrößerung der nach Stimulation des MFB erhaltenen Peaks. Weiterhin ist bei serotonergen Neuronen bekannt, daß diese nur bei länger andauernder Stimulation Transmitter freisetzen [Grahame-Smith, 1971 #105] [Grahame-Smith, 1974 #106] [Elks, 1979 #107].

Ascorbinsäure und DOPAC, die sich ebenfalls in hoher Konzentration im Striatum finden, werden in hohem Maße an der Arbeitselektrode oxidiert und führen zu einer Erhöhung des Stromflusses und damit des Meßsignals. Dieser Vorgang findet jedoch im Gegensatz zur stimulierten DA-Freisetzung kontinuierlich und in einem relativ konstantem Ausmaß statt, so daß sich eine für die Anforderungen der Versuche ausreichend stabile Basislinie einstellt. Rasche Veränderungen dieser Basislinie, z.B. durch Erhöhung der DA-Ausschüttung können exakt erfaßt werden. Langsame Veränderungen fallen nicht ins Gewicht. Zum Beispiel kommt es durch die verstärkte Ausschüttung von DA zu einer meßbaren Erhöhung der DOPAC Konzentration als Folge des DA-Metabolismus.

Durch Oxidationsvorgänge und Verunreinigung der Elektrode *in vivo* kommt es während des Versuchs zu einer Abnahme der Sensitivität. Da davon ausgegangen werden kann, daß dieser Prozeß bei jedem Versuch in gleichem Maße abläuft, wurde angenommen, daß er keine Verfälschung des Ergebnisses beim Vergleich der Gruppen bewirkt. Weiterhin wurden die Elektroden jeweils nur einfach benutzt.

Ein weiteres bei der CPA auftretendes Problem ist die Beeinflussung des Meßsignals durch

Diffusion. Wie bereits weiter oben erwähnt, kommt es nach Applikation des kontinuierlichen Redoxpotentials zu einem Abfall des Stromflusses durch die Elektrode. Nach wenigen Minuten verringert sich dieser Abfall, so daß es zu einer asymptotischen Annäherung an eine hypothetische Basislinie kommt. Diese Basislinie kann für die Anforderungen der Versuche als stabil bezeichnet werden. Der Grund für das Absinken des Stromflusses ist, daß die unmittelbare Umgebung der Arbeitselektrode durch die Oxidation des DA an unoxidiertem DA verarmt. Dieser Vorgang dehnt sich immer weiter in die Umgebung der Arbeitselektrode aus, so daß DA aus immer größeren Entfernungen herandiffundieren muß, um an die Elektrode zu gelangen und dort durch Oxidation ein Signal zu erzeugen. Nach wenigen Minuten stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Herandiffusion und Verbrauch ein, so daß der Stromfluß relativ konstant bleibt. Nach der Stimulation des MFB und der exzessiven Freisetzung von DA in den Extrazellulärraum überlagern sich die Vorgänge der Diffusion mit denen der Wiederaufnahme, so daß es schwer möglich ist, beide Vorgänge zu differenzieren.

Durch die Inhomogenität des Striatums bedingt – es gibt Gebiete mit hoher und Gebiete mit niedriger Freisetzung – kommt es teils zu längeren Diffusionsstrecken. Dies führt dazu, daß auch nach Ende der Stimulation ein weiteres Ansteigen des DA-Peaks beobachtet werden konnte. Dieser Effekt wird noch durch die Tatsache verstärkt, daß DA eine Art Zwischenstellung zwischen Neurotransmitter und Hormon einnimmt. So wird es teilweise an Strukturen freigesetzt in deren unmittelbarer Nähe sich keine postsynaptische Membran befindet, so daß es zur Entfaltung einer Wirkung über eine längere Strecke diffundieren muß. Bei Vorversuchen war mit kleineren Impulszahlen experimentiert worden und dabei trat der oben genannte Effekt besonders deutlich hervor. Bei der Auswertung der Kurven mit Modell 1 wird nur der exponentielle untere Bereich der Kurve in die Auswertung mit einbezogen. Auch Modell 2 wertet nicht den gesamten Peak, sondern nur den linearen und den exponentiellen Teil der Kurve aus. Dadurch werden die Bereiche der Kurve in denen sich die Diffusionseffekte besonders deutlich darstellen nicht berücksichtigt. Ein exakteres Modell wurde von Schönfuß erarbeitet [Schönfuß, 2001 #110]. Hierbei wird der gesamte Verlauf der Kurve inklusive der Stimulation an ein Modell angepaßt. Dieses Modell eignet sich jedoch nur für geringe Stimulationspulszahlen und nicht für die hier verwendeten 100 Impulse.

Ebenfalls wurde dem Problem der Inhomogenität des Striatums Rechnung getragen indem die Länge der Kohlefasern mit 300µm relativ groß gewählt wurde. Dadurch wurden lokale

Unterschiede über die Länge der Kohlefaser ausgeglichen.

Weiterhin fiel während der Versuche auf, daß die Menge der DA-Ausschüttung interindividuell erheblich schwankte. Wünschenswert für die Auswertung mit den mathematischen Modellen wäre sicherlich eine relativ gleichbleibende Freisetzung gewesen. Besonders auffällig bei diesen Phänomenen war eine jahreszeitliche Schwankung. Besonders in den Sommermonaten war es oft nicht möglich mit 200 Impulsen zu stimulieren, da es schon vor dem Ende der Stimulation zu einem Abknicken der Meßkurve kam. Dieses Phänomen kam zustande, obwohl die Tiere unter stabilen Bedingungen gehalten wurden, die keine jahreszeitlichen Schwankungen aufwiesen. Ursache für die Unterschiede in der Peakhöhe kann eine extrem beschleunigte DA-Wiederaufnahme gewesen sein oder aber eine Erschöpfung der dopaminergen Speicherpools. Für die erste These spricht, daß nach Applikation des DAT-Hemmstoffes GBR 12909 auch bei den Tieren mit dem während der Stimulation abknickenden DA-Peak ein hohes Signal erhalten wurde. Auch bei diesen Tieren war also ausschüttungsfähiges DA vorhanden und erzeugte ein hohes Signal nachdem der DAT mit GBR 12909 ausgeschaltet worden war.

Die hohe interindividuelle Schwankung der k und v_{\max} -Werte ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die große Beeinflußbarkeit sowohl der CPA als auch der striatalen DA-Konzentration durch oben beschriebene, experimentell schwer kontrollierbare Einflüsse zurückzuführen.

Wie bereits oben erwähnt, können viele der diskutierten Probleme durch die Verwendung des selektiven DAT-Hemmstoffes GBR 12909 und die Berechnung der durch GBR 12909 erzeugten Differenz der DA-Clearance zwar nicht völlig ausgeschaltet, jedoch weitgehend minimiert, werden. Dies sollte ausreichen, eventuell vorhandene Unterschiede der DAT-Funktion zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren nachzuweisen.

6.3 Ergebnisse

Die Untersuchungen zur synaptosomalen DA-Freisetzung in dieser Arbeit haben ergeben, daß bei den Ratten, die das Gen für die Antisense-m-RNA trugen, die freigesetzten Mengen an DA, signifikant geringer waren, als die in einer Kontrollgruppe. Es kann davon ausgegangen werden, daß es durch die Antisense-m-RNA zu einer Verringerung der Expression der TPH gekommen ist, die zu einer Einschränkung in der Verfügbarkeit von Serotonin geführt hat. In zahlreichen Arbeiten wurde beschrieben, daß Serotonin allein oder die Stimulation bestimmter Serotonin-Rezeptor-Subpopulationen die Freisetzung von DA steigert [Benloucif, 1991 #2] [Benloucif, 1993 #3] [Blandina, 1989 #4] [Matsumoto, 1999 #101]. Die Resultate der hier vorliegenden Arbeit sind also im Einklang mit diesen Arbeiten, wenn man im Umkehrschluß annimmt, daß eine erniedrigte Verfügbarkeit von Serotonin eine verringerte Freisetzung von DA zur Folge hat. Weiterhin wurde gezeigt, daß Serotoninrezeptorantagonisten die Aktivität des dopaminergen Systems herabsetzen. So konnte die durch Erhöhung der Serotonin-Konzentration verursachte Steigerung der DA-Konzentration im präfrontalen Kortex durch die Blockade von 5-HT_{1B}-Rezeptoren verhindert werden [Matsumoto, 1999 #101]. Auch diese Beobachtung spricht dafür, daß ein bestimmter Tonus des serotonergen Systems den DA-Spiegel auf einem bestimmten Niveau hält. Fällt dieser Einfluß weg, oder wird die Übertragung der Information z.B. durch Serotoninrezeptorantagonisten verhindert, führt das zu einer Erniedrigung des DA-Spiegels. Die neurotoxische Läsion des serotonergen Systems mit 5,7-DHT führte neben einer Verringerung der Aktivität der TPH und sukzessiver Abnahme der extrazellulären Serotonin-Konzentration auch zu einer erniedrigten Tyrosinhydroxylaseaktivität und einem verringerten extrazellulären DA-Spiegel im Striatum der Ratte [Liston, 1982 #100] [Giambalvo, 1978 #99]. Auch dort kam es, wie bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei einer Einschränkung der Funktion des serotonergen Systems zu einer Verringerung der dopaminergen Transmission.

Wie unter 3.3. beschrieben, hat das dopaminerge System einen inhibitorischen Einfluß auf das serotonerge System. Beide Systeme scheinen hinsichtlich der extrazellulären Transmitterkonzentration in einer Art selbstlimitierendem Regelkreis zu funktionieren. Das serotonerge System wirkt erregend auf das dopaminerge System, welches wiederum einen hemmenden Einfluß auf das serotonerge System hat.

Die zuvor schon erwähnte Arbeit von *Kay* [Kay, 2001 #114] untersuchte die hochaffine DA-Wiederaufnahme nach einer neurotoxischen Läsion der Raphekerne mit 5,7-DHT. Dabei wurde mit der, auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, Continuous Potential Amperometry eine signifikant verlangsamte Wiederaufnahme von DA aus dem extrazellulären Raum beobachtet. Eine Quantifizierung der DA-Freisetzung wurde in der Arbeit von *Kay* jedoch nicht vorgenommen. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte signifikante Erniedrigung der synaptosomalen DA-Freisetzung ist in Einklang mit diesem Resultat. Kommt es durch Beeinträchtigung des serotonergen Systems zu einer verminderten Freisetzung von DA, kann dies durch Adaptationsvorgänge an der Synapse kompensiert werden. Die Wirkung eines Transmitters hängt hauptsächlich von der freigesetzten Menge, der Wiederaufnahme und der Wirkung am Rezeptor ab. Eine erniedrigte Freisetzung kann durch eine verringerte Extraktion des Transmitters aus dem synaptischen Spalt kompensiert werden. Up- oder Downregulation von Transporter- oder Rezeptormolekülen aufgrund veränderten Transmitter- oder Hormonangebotes sind Vorgänge, die ein vielfach beschriebenes Prinzip in biologischen Systemen darstellen und auch andere Mechanismen (Phosphorylierung, D2-Stimulation) können die Wiederaufnahmeleistung des DAT beeinflussen. Vice versa kann sich die Ausschüttung an die verringerte Extraktion anpassen. So findet sich bei Mäusen, die durch ein Knockout keinen DAT mehr exprimieren, eine signifikant verringerte Freisetzung von DA nach elektrischer Stimulation [Benoit-Marand, 2000 #96].

Im Gegensatz zur Arbeit von *Kay* in der sich nach 5,7-DHT-Läsion der Raphekerne adulter Ratten eine erniedrigte DA-Wiederaufnahme bei den Ratten mit dem veränderten serotonergen System feststellen ließ, konnte in der vorliegenden Arbeit ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden. Beide Arbeiten unterschieden sich nicht nur in einem methodischen Detail, sondern eher komplex. Während in der Arbeit von *Kay* eine postpartale, akute Veränderung des normal entwickelten serotonergen Systems herbeigeführt wurde, bestand die Abweichung im serotonergen System der transgenen Ratten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, bereits kongenital. Dies bedeutet, daß sich das Gehirn bereits während der Embryonalentwicklung mit der Veränderung auseinandersetzen mußte, bzw. Kompensationsmechanismen ausbilden konnte. Der Vorteil kongenitaler Veränderungen ist die bessere Annäherung an die pathologische Situation beim erkrankten Individuum, bei dem die Veränderungen meist schon genetisch determiniert sind und nicht durch invasive Eingriffe herbeigeführt werden.

Die Serotonin-Gehaltsbestimmungen nach 5,7-DHT-Läsion in der Arbeit von *Kay* ergaben signifikant erniedrigte Serotoninspiegel. Bei den transgenen Tieren fand sich nur ein Trend hinsichtlich einer Verringerung der Serotonin-Konzentration. Hierfür ist sicherlich die nur heterozygote Ausprägung des Gens für die Antisense-m-RNA verantwortlich. So ist es wahrscheinlich, daß die Ausprägung der Veränderung des serotonergen Systems nicht stark genug war um Änderungen der Wiederaufnahme von DA herbeizuführen, die durch die angewandte Methodik detektierbar gewesen wäre.

Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß minimale Veränderungen der DA-Wiederaufnahme nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden können. Es ist durchaus möglich, daß die Sensitivität der CPA zur Erfassung sehr kleiner Veränderungen der DA-Wiederaufnahme nicht ausreicht oder daß die biologische Streuung geringe Veränderungen maskiert. So wurde mehrfach über die starke Beeinflussung der CPA durch Diffusionsvorgänge berichtet [Schönfuß, 2001 #110] [Nicholson, 1995 #114]. Dieser Fakt bedingt unter anderem eine starke Streuung der erhaltenen Ergebnisse.

Nimmt man eine Veränderung der DAT-Dichte als Ursache für eine Veränderung der hochaffinen Wiederaufnahme von DA an [Reum, 1995 #29] [Schäfer, 1995 #30], wäre die immunhistochemische Bestimmung der DAT-Dichte ein interessanter Gegenstand weiterer Forschung an den transgenen Tieren.

Abschließend läßt sich sagen, daß die vorliegende Arbeit ein zum besseren Verständnis der Interaktionen des serotonergen und dopaminergen Transmissionssystems beigetragen hat. Sie reiht sich in eine große Zahl von Arbeiten ein, die einen stimulatorischen Einfluß des serotonergen auf das dopaminerge Transmissionssystem beschreiben. Dieses Wissen wird dazu beitragen die Therapie heute nur unzureichend verstandener psychiatrischen Krankheiten wie Schizophrenie und Depression zu verbessern. Vielfach wurden bei diesen Krankheiten Abweichungen in isolierten Transmissionssystemen beschrieben. Diese Arbeit gibt ebenfalls weitere Hinweise darauf, daß diese Abweichungen nicht die kausale Ursache der Erkrankung sein müssen. Eng interagierende Transmissionssysteme müssen sowohl aus ätiologischem Interesse, als auch hinsichtlich therapeutischer Möglichkeiten genau ins Auge gefaßt werden.

Zusammenfassung

Das dopaminerge und das serotonerge Transmissionssystem sind zwei wichtige Transmissionssysteme, die in eine Vielzahl von Krankheiten des ZNS involviert sind. Es ist gut bekannt, daß eine enge Interaktion zwischen beiden Systemen stattfindet. Krankheiten des ZNS, die sich auf umschriebene Veränderungen zurückführen lassen, haben durch die Interaktionen von Transmissionssystemen weitreichende Folgen auf verschiedene Bereiche des Gehirns. Neuere Therapien machen sich diese Interaktionen zunutze, um in das Krankheitsgeschehen einzugreifen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion des dopaminergen Systems auf eine genetische Veränderung im serotonergen System untersucht. Die untersuchten transgenen Tiere besaßen ein Gensequenz, die für eine Antisense-m-RNA gegen die m-RNA der TPH kodierte. Die TPH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Serotoninbiosynthese. Zur Charakterisierung des dopaminergen Systems wurden die Freisetzung und die hochaffine Wiederaufnahme durch den DAT als Parameter ausgewählt.

Die Freisetzung aus Synaptosomenpräparationen war bei den transgenen Tieren signifikant gegenüber den nicht-transgenen Tieren erniedrigt. Bei der hochaffinen Wiederaufnahme ließen sich keine Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren feststellen. Die beobachtete Erniedrigung der Freisetzung bestätigt die Erkenntnisse einer Vielzahl von Studien, die einen stimulatorischen Einfluß von Serotonin auf das dopaminerge System beschreiben.

Abstract

The dopaminergic and the serotonergic transmission systems are two important systems that are involved in a great number of central nervous system (CNS) diseases. It has long been known that a close interaction exists between them. Due to the interactions of transmission systems diseases of the CNS located on a identifiable spot have far-reaching consequences on other systems. Newer therapies take advantage of these interactions in order to interfere with the pathologic process.

This study was performed to investigate how the dopaminergic system reacts to a alteration in the serotonergic system. The observed transgenic animals carried the gene for an antisense-construct against the m-RNA of tryptophanhydroxylase (TPH). TPH catalyzes the rate limiting step in serotonin biosynthesis. In order to characterize the dopaminergic system 2 parameters were chosen: dopamine release and dopamine high affinity reuptake.

The following results were obtained: Release of dopamine from synaptosomal preparations was decreased significantly in comparison to non-transgenic control animals. No difference concerning high affinity dopamine reuptake measured by continuous potential amperometry was noted.

The findings concerning release of dopamine are in line with studies describing a facilitatory effect of serotonin on the dopaminergic system.

Literaturverzeichnis

- Amalric,M., Koob,G.F. (1993) Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system. *Prog.Brain Res.* 99: S.209-226 #84
- Anden,N.E., Dahlstrom,A., Fuxe,K., Larsson,K. (1965) Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon. *Life Sci.* 4: S.1275-1279 #109
- Arbuthnott,G.W., Fairbrother,I.S., Butcher,S.P. (1990) Dopamine release and metabolism in the rat striatum: an analysis by 'in vivo' brain microdialysis. *Pharmacol.Ther.* 3: S.281-293 #38
- Ashby,CR.Jr., Jean-Pol,T, Ashby, CR. (Hrsg.) (1996) The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters.: The modulation of dopaminergic neurotransmission by norepinephrine. CRC Press, Inc., Boca Raton, 0-8493-4780-7, Band 1, S.1-42 #55
- Barkley,R.A. (1998) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Sci.Am.* 3: S.66-71 #7
- Bitzan,M., Marsden,P.A., (1996) Polymerase Chain Reaction: Principles and Methods. Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia S.89-99 #119
- Bellivier,F., Leboyer,M., Courtet,P., Buresi,C., Beaufils,B., Samolyk,D., Allilaire,J.F., Feingold,J., Mallet,J., Malafosse,A. (1998) Association between the tryptophan hydroxylase gene and manic-depressive illness [see comments] *Arch.Gen.Psychiatry* 1: S.33-37 #39
- Benloucif,S., Galloway,M.P. (1991) Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis. *Eur.J.Pharmacol.* 1: S.1-8 #2

- Benloucif,S., Keegan,M.J., Galloway,M.P. (1993) Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1: S.373-377 #3
- Benoit-Marand,M., Jaber,M., Gonon,F. (2000) Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur.J.Neurosci.* 12: S.2985-2992 #96
- Berger,T.W., Kaul,S., Stricker,E.M., Zigmond,M.J. (1985) Hyperinnervation of the striatum by dorsal raphe afferents after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats. *Brain Res.* 336: S.354-358 #83
- Blandina,P., Goldfarb,J., Craddock-Royal,B., Green,J.P. (1989) Release of endogenous dopamine by stimulation of 5-hydroxytryptamine₃ receptors in rat striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 3: S.803-809 #4
- Blue,M.E., Yagaloff,K.A., Mamounas,L.A., Hartig,P.R., Molliver,M.E. (1988) Correspondence between 5-HT₂ receptors and serotonergic axons in rat neocortex. *Brain Res.* 1-2: S.315-328 #40
- Boadle-Biber,M.C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 60: S.1-15 #89
- Caviness,J.N., Wightman,R.M (1982) Use of rapid superfusion to differentiate the release of dopamine from striatal tissue induced by sympathomimetic amines from release induced by potassium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1: S.90-96 #41
- Chergui,K., Suaud Chagny,M.F., Gonon,F. (1994) Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo. *Neurosci.* 62: S.641-5 #120
- Churchill L, Kalivas PW (1996) Ashby RA Jr. (Hrsg.) The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters: Dopamine-opioid interactions in the basal forebrain. CRC Press, Inc., Boca Raton, 0-8493-4780-7, Band 1: S.55-73 #59

- Conn,P.J., Sanders-Bush,E. (1987) Central serotonin receptors: effector systems, physiological roles and regulation. *Psychopharmacology (Berl.)* 92: S.267-277 #72
- Cook,E.H.,Jr, Stein,M.A., Krasowski,M.D., Cox,N.J., Olkon,D.M., Kieffer,J.E., Leventhal,B.L. (1995) Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene.*Am.J.Hum.Genet. Am.J.Hum.Genet.* 4: S.993-998 #7
- Crooke S.T., Crooke S.T.(Hrsg) (1998) Basic principle of antisense therapeutics *Antisense research and application. Springer-Verlag Berlin* 3-540-63833-4, Band1: S.3 #65
- Dahlstrom,A., Fuxe,K. (1965) Evidence for the existence of an outflow of noradrenaline nerve fibres in the ventral roots of the rat spinal cord. *Experientia* 21: S.409-410 #70
- De,Bellerocche J., Bradford,H.F. (1978) Biochemical evidence for the presence of presynaptic receptors on dopaminergic nerve terminals. *Brain Res.* 1: S.53-68 #42
- De,Langen CD, Stoof,J.C., Mulder,A.H. (1979) Studies on the nature of the releasable pool of dopamine in synaptosomes from rat corpus striatum: depolarization-induced release of 3H-dopamine from superfused synaptosomes labelled under various conditions. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1: S.41-49 #9
- De,Simoni MG, Dal,Toso G., Fodritto,F., Sokola,A., Algeri,S. (1987) Modulation of striatal dopamine metabolism by the activity of dorsal raphe serotonergic afferences. *Brain Res.* 1: S.81-88 #10
- Di Matteo V., Di,Giovanni G., Di,Mascio M., Esposito,E. (2000) Biochemical and electrophysiological evidence that RO 60-0175 inhibits mesolimbic dopaminergic function through serotonin (2C) receptors. *Brain Res.* 865: S.85-90 #97
- Dray,A., Gonye,T.J., Oakley,N.R., Tanner,T. (1976) Evidence for the existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. *Brain Res.* 1: S.45-57 #11
- Dugast,C., Suaud-Chagny,M.F., Gonon,F. (1994) Continuous in vivo monitoring of

- evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens by amperometry. Neuroscience 3: S.647-654 #43
- Dunnett,S.B., Robbins,T.W. (1992) The functional role of mesotelencephalic dopamine systems. Biol.Rev.Camb.Philos.Soc. 67: S.491-518 #95
- Elks,M.L., Youngblood,W.W., Kizer,J.S. (1979) Synthesis and release of serotonin by brain slices: effect of ionic manipulations and cationic ionophores. Brain Res. 172: S.461-469 #107
- Erikson,K.M., Jones,B.C., Beard,J.L (2000) Iron deficiency alters dopamine transporter functioning in rat striatum J.Nutr. 130: S.2831-2837 #98
- Freeman AS, Ashby RA Jr. (Hrsg.) (1996) The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters.:Electrophysiological and biochemical interactions between dopamine and cholecystokinin in the brain. CRC Press, Inc., Boca Raton, 0-8493-4780-7, Band 1: S. 123-142 #57
- Giambalvo,C.T., Snodgrass,S.R. (1978) Biochemical and behavioral effects of serotonin neurotoxins on the nigrostriatal dopamine system: comparison of injection sites. Brain Res. 152: S.555-566 #99
- Gelernter,J., Kranzler,H., Lacobelle,J. Population studies of polymorphisms at loci of neuropsychiatric interest (tryptophan hydroxylase (TPH), dopaminetransporter protein (SLC6A3), D3 dopamine receptor (DRD3), apolipoprotein E (APOE), mu opioid receptor (OPRM1), and ciliary neurotrophic factor (CNTF)). Genomics 52: S.289-97 #115
- Grahame-Smith,D.G. (1964) Tryptophan hydroxylation in brain. Biochem.Biophys.Res.Comm. 6: S.586-592 #44
- Grahame-Smith,D.G. (1971) Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. J.Neurochem. 18: S.1053-1066 #105

- Grahame-Smith,D.G. (1974) How important is the synthesis of brain 5-hydroxytryptamine in the physiological control of its central function? Adv.Biochem.Psychopharmacol. 10: S.83-91 #106
- Grenett,H.E., Ledley,F.D., Reed,L.L., Woo,S.L. (1987) Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 16: S.5530-5534 #12
- Hamon,M., Bourgoih,S., Morot-Gaudry,Y., Glowinski,J.U (1972) End product inhibition of serotonin synthesis in the rat striatum. Nat.New Biol. 75: S.184-187 #13
- Hery,F., Soubrie,P., Bourgoin,S., Motastruc,J.L., Artaud,F., Glowinski,J. (1980) Dopamine released from dendrites in the substantia nigra controls the nigral and striatal release of serotonin. Brain Res. 193: S.143-151 #80
- Horn,A.S. (1990) Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. Prog.Neurobiol. 5: S.387-400 #15
- Hurd,Y.L., Ungerstedt,U. (1989) Influence of a carrier transport process on in vivo release and metabolism of dopamine: dependence on extracellular Na+. Life Sci. 4: S.283-293 #45
- Jones,S.R., Gainetdinov,R.R., Jaber,M., Giros,B., Wightman,R.M., Caron,M.G. (1998) Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 7: S.4029-4034 #16
- Justice JB Jr. (1987) Voltammetry in the neurosciences: Introduction to in vivo voltammetry. NJ Hrsg.: Humana Press, Clifton, ISBN: 0-89603-103-9 S.8 #60
- Justice,J.B.,Jr, Nicolaysen,L.C., Michael,A.C. (1988) Modeling the dopaminergic nerve terminal. J.Neurosci.Methods 3: S.239-252 #17
- Karstaedt,P.J., Kerasidis,H., Pincus,J.H., Meloni,R., Graham,J., Gale,K. (1994) Unilateral

- destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. *Exp.Neurol.* 126: S.25-30 #81
- Kawasaki,K., Czeh,G., Somjen,G.G. (1988) Prolonged exposure to high potassium concentration results in irreversible loss of synaptic transmission in hippocampal tissue slices. *Brain Res.* 457: S.329-329 #108
- Kay,S. (2001) Untersuchungen zur Interaktion aminerger Transmissionssysteme: Auswirkung serotonerger Läsionen auf den striatalen hochaffinen Dopamin-Reuptake im Gehirn der Ratte. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt Universität zu Berlin #114
- Kellam MD, Chiodo LA, Ashby CR Jr. (Hrsg.) (1996) The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters: Serotonergic modulation of midbrain dopamine systems. CRC Press, Inc., Boca Raton, ISBN: 0-8493-4780-7, Band 1, S.87-105 #58
- Khozhaï,L.I., Puchkov,V.F., Otellin,V.A. (1995) [The effect of a serotonin deficiency on mammalian embryonic development] *Ontogenez.* 5: S.350-355 #46
- Kopin,I.J. (1985) Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol.Rev.* 4: S.333-364 #47
- Kristensen,H.K., Lau,Y.Y., Ewing,A.G. (1994) Capillary electrophoresis of single cells: observation of two compartments of neurotransmitter vesicles. *J.Neurosci.Methods* 2: S.183-188 #48
- Leslie,M.J., Bennett-Clarke,C.A., Rhoades,R.W. (1992) Serotonin 1B receptors form a transient vibrissa-related pattern in the primary somatosensory cortex of the developing rat. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 69: S.143-148 #68
- Letchworth,S.R., Sexton,T., Childers,S.R., Vrana,K.E., Vaughan,R.A., Davies,H.M., Porrino,L.J. (1999) Regulation of rat dopamine transporter mRNA and protein by chronic cocaine administration. *J.Neurochem.* 5: S.1982-1989 #49

- Lidov, H.G., Molliver, M.E. (1982) Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res. Bull.* 9: S.559-604 #67
- Liston, D.R., Franz, D.N., Gibb, J.W. (1982) Biochemical evidence for alteration of neostriatal dopaminergic function by 5,7-dihydroxytryptamine. *J. Neurochem.* 38: S.13329-1335 #100
- Lovenberg, W., Jequier, E., Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 759: S.217-219 #18
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin reagent *J. Biol. Chem.* 193: S.265-275 #104
- Luthman, J., Bolioli, B., Tsutsumi, T., Verhofstad, A., Jonsson, G. (1987) Sprouting of striatal serotonin nerve terminals following selective lesions of nigro-striatal dopamine neurons in neonatal rat. *Brain Res. Bull.* 19: S.269-274 #82
- Macon, J.B., Sokoloff, L., Glowinski, J. (1971) Feedback control of rat brain 5-hydroxytryptamine synthesis. *J. Neurochem.* 3: S.323-331 #19
- Mamounas, L.A., Wilson, M.A., Axt, K.J., Molliver, M.E., (1992) Morphological aspects of serotonergic innervation *Advances in the biosciences* 85: S.97-118 #74
- Mann, J.J., Malone, K.M., Nielsen, D.A., Gelernter, J. (1997) Possible association of a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene with suicidal behaviour in depressed patients. *Am. J. Psych.* 154: S.1451-1453 #116
- Manuck, S.B., Flory, J.D., Ferrell, R.E., Dent, K.M., Mann, J.J., Muldoon, M.F. (1999) Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene. *Biol. Psychiatry* 5: S.603-614 #50
- Marsden, C.A., *The neuropharmacology of serotonin in the central nervous system*
Selective Serotonin Reuptake Inhibitors S.11 Chichester Hrsg.: Feighner, J.P.,

Boyer, W.F., 1 John Wiley & Sons Ltd 1991 0-471-92890-9 #88

Matecka,D., Rothman,R.B., Radesca,L., de,Costa BR, Dersch,C.M., Partilla,J.S., Pert,A., Glowa,J.R., Wojnicki,F.H., Rice,K. (1996) Development of novel, potent, and selective dopamine reuptake inhibitors through alteration of the piperazine ring of 1-[2- (diphenylmethoxy)ethyl]-and 1-[2-[bis (4-fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4- (3-phenylpropyl)piperazines (GBR 12935 and GBR 12909). J.Med.Chem. 24: S.4704-47 #20

Matsumoto,M., Togashi,H., Mori,K., Ueno,K., Miyamoto,A., Yoshioka,M. (1999) Characterization of endogenous serotonin-mediated regulation of dopamine release in the rat prefrontal cortex. Eur.J.Pharmacol. 383: S.39-48 #101

Matthysse,S. (1973) Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? Fed.Proc. 2: S.200-205 #21

Mc Mahon H.T., Nicholls D.G., (1991) The bioenergetics of neurotransmitter release Biophysica Acta 1059: S.243-264 #64

McCarthy,M.M., Nielsen,D.A., Goldman,D. (1995) Antisense oligonucleotide inhibition of tryptophan hydroxylase activity in mouse brain Regul.Pept. 2: S.163-170 #22

Meiergerd,S.M., Patterson,T.A., Schenk,J.O. (1993) D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. J.Neurochem. 2: S.764-7 #111

Meyer,V.R. (1999) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Otto Salle Verlag GmbH & Co, Frankfurt am Main, ISBN:3-7935-542-X, S.13 CRC Press, Inc., Boca Raton, 0-8493-4780-7, Band 1 #62

Minabe,Y., Emori,K., Ashby,C.R.,Jr (1996) The depletion of brain serotonin levels by para-chlorophenylalanine administration significantly alters the activity of midbrain dopamine cells in rats: an extracellular single cell recording study. Synapse 22: S.46-53 #77

- Mulligan,K.A., Tork,I. (1988) Serotonergic innervation of the cat cerebral cortex. J.Comp.Neurol. 270: S.86-110 #73
- Muramatsu,M., Tamaki-Ohashi,J., Usuki,C., Araki,H., Chaki,S., Aihara,H. (1988) 5-HT2 antagonists and minaprine block the 5-HT-induced inhibition of dopamine release from rat brain striatal slices. Eur.J.Pharmacol. 1: S.89-95 #23
- Nakajima,K., Matsuyama,K., Mori,S. (1998) Prenatal administration of parachlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. Neurosci.Res. 2: S.165-169 #24
- Near,J.A., Bigelow,J.C., Wightman,R.M. (1988) Comparison of uptake of dopamine in rat striatal chopped tissue and synaptosomes. J.Pharmacol.Exp.Ther. 245: S.921-927 #78
- Nicholson,C. (1985) Diffusion from an injected volume of a substance in brain tissue with arbitrary volume fraction and tortuosity. Brain.Res. 333: S.325-329 #114
- Nielsen,D.A., Goldman,D., Virkkunen,M., Tokola,R., Rawlings,R., Linnoila,M. (1994) Suicidality and 5-hydroxyindoleacetic acid concentration associated with a tryptophan hydroxylase polymorphism. Arch.Gen.Psychiatry 1: S.34-38 #25
- Nikkah,G., Cunningham,M.G., Jodicke,A., Knappe,U., Bjorklund,A. (1994) Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. Brain Res. 633: S.133-143 #76
- Numan,S., Lundgren,K.H., Wright,D.E., Herman,J.P., Seroogy,K.B. (1995) Increased expression of 5HT2 receptor mRNA in rat striatum following 6-OHDA lesions of the adult nigrostriatal pathway. Brain Res.Mol.Brain Res. 29: S.391-396 #87
- Paik,I., Toh,K., Kim,J., Lee,C. (2000) TPH Gene May Be Associated with Suicidal Behavior, but Not with Schizophrenia in the Korean Population. Hum.Hered: 6: S.365-369 #51

- Parent,A., Descarries,L., Beaudet,A. (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 2: S.115-138 #26
- Park,D.H., Stone,D.M., Baker,H., Kim,K.S., Joh,T.H. (1994) Early induction of rat brain tryptophan hydroxylase (TPH) mRNA following parachlorophenylalanine (PCPA) treatment. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1-4: S.20-28 #27
- Parsons,L.H., Justice,J.B.,Jr (1993) Perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 2: S.195-199 #28
- Paxinos,G., Watson C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press New York
- Peroutka,S.J., Snyder,S.H. (1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. *Mol.Pharmacol.* 16: S.687-699 #71
- Pinter,M.M., Alesch,F., Murg,M., Seiwald,M., Hellscher,R.J., Binder,H. (1999) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for control of extrapyramidal features in advanced idiopathic parkinson's disease: one year follow-up. *J.Neural Transm.* 106: S.693-709 #102
- Rajaofetra,N., Sandillon,F., Geffard,M., Privat,A. (1989) Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J.Neurosci.Res.* 22: S.305-321 #69
- Reum,T., Schonfuss,D., Schafer,U., Marburger,A., Drandarevski,N., Morgenstern,R. (1995) Fetal mesencephalic grafts decrease the rate of dopamine uptake in the non-lesioned striatum of unilaterally 6-OHDA lesioned rats: an in vivo voltammetric study. *Neurosci.Lett.* 3: S.218-222 #29
- Ross,G.D. (1982) Structure and function of membrane complement receptors. Summary. *Fed.Proc.* 41: S.3089-3093 #92

- Rubenstein,J.L. (1998) Biol.Psychiatry Development of serotonergic neurons and their projections. 44: S.145-150 #103
- Schafer,U., Reum,T., Schonfuss,D., Marburger,A., Morgenstern,R. (1995) Grafts modulate dopamine transporters of the non-lesioned striatum. Neuroreport. 14: S.1833-1836 #30
- Schinke,M., Baltatu,O., Bohm,M., Peters,J., Rascher,W., Bricca,G., Lippoldt,A., Ganten,D., Bader,M. (1999) Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 7: S.3975-3980 #52
- Schönfuß,D., Reum,T., Olshausen,P., Fischer,T., Morgenstern,R. (2001) Modelling constant potential amperometry for investigations of dopaminergic neurotransmission kinetics in vivo. J.Neurosci.Meth. 112: S.163-172 #110
- Shaskan,E.G., Snyder,S.H. (1970) Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake. J.Pharmacol.Exp.Ther. 175: S.404-418 #93
- Shemer,A., Whitaker-Azmitia,P.M., Azmitia,E.C. (1988) Effects of prenatal 5-methoxytryptamine and parachlorophenylalanine on serotonergic uptake and behavior in the neonatal rat. Pharmacol.Biochem.Behav. 4: S.847-851 #32
- Slotkin,T.A., Seidler,F.J., Whitmore,W.L., Lau,C., Salvaggio,M., Kirksey,D.F. (1978) Rat brain synaptic vesicles: uptake specificities of [3H]norepinephrine and [3H]serotonin in preparations from whole brain and brain regions J.Neurochem. 31: S.961-968 #94
- Spanagel,R., Weiss,F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. Trends.Neurosci. 11: S.521-527 #33
- Specht,L.A., Pickel,V.M., Joh,T.H., Reis,D.J. (1981) Fine structure of the nigrostriatal

- anlage in fetal rat brain by immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase. *Brain Res.* 218: S.49-65 #75
- Steward,L.J., Ge,J., Stowe,R.L., Brown,D.C., Bruton, R.K., Barnes,N.M. (1996) Ability of 5-HT₄ receptor ligands to modulate rat striatal dopamine release in vitro and in vivo. *Br.J.Pharmacol.* 117: S.55-62 #118
- Takeuchi,Y., Sawada,T., Blunt,S., Jenner,P., Marsden,C.D. (1991) Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on striatal serotonin innervation in adult rats. *Brain Res.* 562: S.301-305 #85
- Tennyson,V.M., Heikkila,R., Mytilineou,C., Cote,L., Cohen,G. (1974) 5-Hydroxydopamine 'tagged' neuronal boutons in rabbit neostriatum: interrelationship between vesicles and axonal membrane. *Brain Res.* 2: S.341-348 #35
- Tsai,S.J., Hong,C.J., Wang,Y.C. (1999) Tryptophan hydroxylase gene polymorphism (A218C) and suicidal behaviors. *Neuroreport.* 18: S.3773-3775 #53
- Wallace,J.A., Lauder,J.M. (1983) Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res.Bull.* 10: S.459-479 #66
- Walters JR, Pucak ML, (1996) The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters: The modulation of midbrain dopaminergic systems by GABA. CRC Press Inc., Boca Raton, ISBN:0-8493-4780-7, Band 1: S. 157-175 #56
- Walther,D.J., Bader,M., (1999) Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 68: S.55-63 #61
- Wightman,R.M., Zimmerman,J.B. (1990) Control of dopamine extracellular concentration in rat striatum by impulse flow and uptake. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 15: S.135-144 #79
- Wilson,J.M., Nobrega,J.N., Carroll,M.E., Niznik,H.B., Shannak,K., Lac,S.T.,

- Pristupa,Z.B., Dixon,L.M., Kish,S.J. (1994) Heterogeneous subregional binding patterns of 3H-WIN 35,428 and 3H-GBR 12,935 are differentially regulated by chronic cocaine self-administration. J.Neurosci. 5(2): S.2966-2979 #36
- Yadid,G., Pacak,K., Kopin,I.J., Goldstein,D.S. (1994) Endogenous dopamine stimulates striatal dopamine release in conscious rats. JPET 270: S. 1158-1165 #117
- Yang,X.J., Kaufman,S. (1994) High-level expression and deletion mutagenesis of human tryptophan hydroxylase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 14: S.6659-6663 #37
- Zahniser, N.R. (1997) Regulation of the dopamine transporter and cocaine sensitization. NIDA (National Institute on drug abuse) Cocaine and a changing brain (Ernest Morial, Convention Center, New Orleans): S.23-29 #112
- Zhou,F.C., Bledsoe,S., Murphy,J. (1991) Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. Brain Res. 556: S.108-116 #86

Schlagworte

dopaminerg

serotonerg

transgen

Ratte

Tryptophanhydroxylase

antisense

Kontinuierliche Amperometrie

Keywords

dopaminergic

serotonergic

transgenic

rat

antisense

tryptophanhydroxylase

continuous potential amperometry

Danksagung

Diese Arbeit entstand zwischen April 1998 und August 2001 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.

Für die Überlassung des Themas und die Übernahme der Arbeit, die hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, Förderung in verschiedener Form sowie sehr guten Arbeitsbedingungen im Labor möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Morgenstern sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Marburger, ohne deren exzellente, freundschaftliche Betreuung und effiziente Einführung in wissenschaftliche Arbeitsweisen diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Weiterhin bin ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Professor Morgenstern für die Unterstützung meiner Arbeit und die nette Arbeitsatmosphäre sehr zu Dank verpflichtet. Für die Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Professor Theuring bedanken, ebenso bei Herrn Dr. Sohr, der mir bei Fragen zur Analytik hilfsbereit zur Seite stand.

Curriculum vitae

Schulausbildung

Juli 1994: Erlangung der Hochschulreife in Pirna (Durchschnittsnote: 1,6)

Studium

- Oktober 1994 : Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin
- 03.05.2002 : Ärztlichen Prüfung, Note: Gut

Famulaturen

- 09/97 – 10/97: Krankenhausfamulatur am Hedwigs-Krankenhaus, Berlin Mitte, Fachgebiet: Innere Medizin (Onkologie)
- 03/98: Krankenhausfamulatur am Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“, Dresden, Fachgebiet: Radiologie
- 08/98 – 09/98: Krankenhausfamulatur am Central Regional Hospital, Cape Coast, Ghana, Fachgebiet: Innere Medizin (Tropenkrankheiten)
- 08/99: Krankenhausfamulatur am Maelor Hospital Wrexham, Großbritannien, Fachgebiet: Chirurgie
- 09/00 – 10/00: Praxisfamulatur, Bahratal (Sachsen), Fachgebiet: Allgemeinmedizin und Naturheilverfahren

Praktisches Jahr

- 04/01-08/01: Urologie an der Urologischen Klinik der Charité´ Campus Mitte
- 08/01-09/01: Innere Medizin (Kardiologie) am Königin-Elisabeth-Herzberge-Krankenhaus Berlin-Lichtenberg
- 10/01-11/01: Innere Medizin (Gastroenterologie, Nephrologie) am Northwestern Memorial Hospital der Northwestern University in Chicago, USA
- 12/01-03/02: Chirurgie an der Parkklinik Berlin-Weissensee

Beruflicher Werdegang

- seit 09/02 Arzt im Praktikum Klinik für Urologie im Vivantes Klinikum am Friedrichshain

Zusätzliche Ausbildungen / Fähigkeiten

- Juni 2000: United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 1, erreichte Punktzahl: 208
- seit März 2000: Ausbildung in Akupunktur und Traditionell Chinesischer Medizin bei der „Akupunkturgesellschaft Düsseldorf“, Abschlußprüfung der 140-Stunden-Ausbildung am 17.06.2001 bestanden
- 1995 – 1998 : pflegerische Tätigkeit an einer Pflegestation mit Schwerpunkt auf Gerontopsychiatrie, eigenständige Tätigkeit mit psychiatrischen Patienten
- 1998 – 2000 : Tätigkeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der HU-Berlin, Planung und Realisation von Experimenten
- 2001-2002: Tätigkeit in einer nuklearmedizinischen Praxis mit Schwerpunkt auf Radiosynovorthese (Verwaltungsaufgaben, Umgang mit Isotopen, Patientenbetreuung)
- Computerkenntnisse: Erfahrung mit der Erstellung von Internetseiten, Word, Excel, Corel Draw, Netzwerken

Sprachen

- Englisch: fließend
- Russisch: Grundkenntnisse

Berlin, 24.06.2003

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt, die benutzte Literatur sowie Hilfsmittel vollständig erwähnt habe und die Dissertation noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist. Diese Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Sofern fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, ist dies als Quelle und im Literaturverzeichnis angegeben.

Berlin, 01.08.2001

Tom Fischer